M V 40

Über die Inhaltsstoffe der Roßkastanie (Aesculus Hippocastanum L.) und Versuche zu ihrer Gehaltsbestimmung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Klaus R. Overlach
aus Neumünster

Hamburg
1960

Über die Inhaltsstoffe der Roßkastanie (Aesculus Hippocastanum L.) und Versuche zu ihrer Gehaltsbestimmung

BIBLIOTHEK

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Klaus R. Overlach
aus Neumünster

Hamburg
1960

R. INTZ.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Als Manuskript vervielfältigt
in der Fotostelle der Bibliothek des Instituts für Weltwirtschaft, Kiel

Die vorliegende Arbeit wurde 1957 im Laboratorium der Königl. Priv. Apotheke Schönberg/Holstein sowie 1958/59 in den Laboratorien der "Apotheke am Bleeck" Bad Bramstedt/Holstein auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Professor Dr. F. NEUWALD

ausgeführt. Meinem hochverehrten Lehrer möchte ich für seine vielseitigen Anregungen, seine wertvollen Ratschläge sowie sein stetes und allzeitiges Interesse herzlich danken.

Inhaltsverzeichnis.

1. Allgemeiner Teil

Seite

1.1. Einleitung 6
1.2. Geschichte 7
1.3. Botanik 7
1.4. Arzneibücher, Vorschriften, Handelspräparate 8
1.4.1. DAB VI., Ergänzungsband und Nachträge 8
1.4.2. Homöopathisches Arzneibuch (HAB) 8
1.4.3. The Homoeopathic Pharmacopoeia of the USA (HPUS) 9
1.4.4. Vorschläge für das neue Deutsche HAB 9
1.4.5. Codex francais (CF) 1o
1.4.6. Übrige Arzneibücher 1o
1.4.7. Magistralformeln 11
1.4.8. Weitere Verwendungsvorschläge 11
1.4.9. Handelspräparate 11
1.5. Inhaltsstoffe 11
1.5.1. Allgemeine Inhaltsstoffe 11
1.5.2. Inhaltsstoffe, die als Wirkstoffe diskutiert werden 14
1.5.2.1. Saponin 14
1.5.2.1.1. Chemie 14
1.5.2.1.2. Vorkommen in Aesculus Hippocastan. 21
1.5.2.1.3. Gewinnungsmethoden 21
1.5.2.1.3.1. Allgemeine Methoden 21
1.5.2.1.3.2. Patentierte Verfahren 21
1.5.2.1.4. Bestimmungsmethoden 22
1.5.2.2. Flavonoide 24
1.5.2.2.1. Vorkommen in Aesculus Hippocastan. 24
1.5.2.2.1.1. Samen 25
1.5.2.2.1.2. Blätter 25
1.5.2.2.1.3. Blüten 25
1.5.2.2.2. Chemie 26
1.5.2.2.3. Qualitative Nachweise 28
1.5.2.2.4. Quantitative Nachweise 29
1.5.2.2.4.1. Metallkomplexe 29

Seite

1.5.2.2.4.2. Borkomplexe 29
1.5.2.2.4.2.1. WILSON-TAUBÖCK Test 29
1.5.2.2.4.2.2. Tetraphenyl-diboroxyd 3o
1.5.2.3. Kumarine 31
1.5.2.4. Aminopurine 32

1.6. Wirkung und Anwendung 33
1.6.1. Wirkung von Aesculus-Saponin 33
1.6.2. Wirkung der Flavonoide 35
1.6.3. Wirkung der Aesculus-Auszüge 36
1.6.4. Anwendung von Aesculus-Auszügen 36

2. Experimenteller Teil
2.1. Saponin 38
2.1.1. Gewinnung der Reinsubstanzen 38
2.1.1.1. Aufbereitung der Samen 38
2.1.1.2. Extraktionsverfahren 39
2.1.1.2.1. DAB-Methoden 39
2.1.1.2.2. Soxhlet-Extraktion 39
2.1.1.2.3. Ausrühren 4o
2.1.1.2.4. Kochen mit aufgesetztem Rückflusskühler 41
2.1.1.3. Gewinnung von Aescin 41
2.1.1.4. Gewinnung von Aescinol-Kalium 45
2.1.1.5. Gewinnung von Aescinol 46
2.1.1.6. Gewinnung des Genins 46
2.1.1.7. Infrarot-Spektrographie 47
2.1.2. Hämolyse 48
2.1.3. Papierchromatographie 5o
2.1.3.1. Untersuchung von Reinsubstanzen 52
2.1.3.2. Untersuchung von unbehandelten Aesculus-Auszügen 52
2.1.3.3. Untersuchung von vorbehandelten Aesculus-Auszügen 54
2.1.4. Dünnschichtchromatographie 64
2.1.5. Photometrie 64
2.1.5.1. Reaktion mit Chlorsulfonsäure 65
2.1.5.2. Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd - Eisessig - Schwefelsäure 67
2.1.5.2.1. Reagenzlösung 67

Seite

2.1.5.2.2. Aescin-Stammlösung 67
2.1.5.2.3. Aufstellen der typischen Farbkurve 67
2.1.5.2.4. Aufstellen der Eichkurve 69
2.1.5.2.5. Untersuchungen über die Reaktionsbedingungen 69
2.1.5.3. Reaktion mit Kieselwolframsäure 72
2.1.6. Versuche zur chromatographischen Auftrennung der Aesculus-Auszüge 72
2.2. Bestimmung von Flavonoiden mit Flavognost 73
2.2.1. Untersuchungen mit Reinsubstanzen 73
2.2.1.1. Bestimmung von Rutin 74
2.2.1.1.1. Aufstellen der typischen Farbkurve 75
2.2.1.1.2. Aufstellen einer Eichkurve 75
2.2.1.2. Bestimmung von Quercitrin 78
2.2.1.2.1. Aufstellen der typischen Farbkurve 78
2.2.1.2.2. Aufstellen der Eichkurve 78
2.2.1.3. Bestimmung von Quercetin 82
2.2.1.4. Vergleich der Ergebnisse mit Reinsubstanzen 82
2.2.2. Untersuchungen mit Extrakten 84
2.2.2.1. Untersuchungen mit Blatt-Extrakten 84
2.2.2.1.1. Aufstellen der typischen Farbkurve 84
2.2.2.1.2. Flavonoidgehalt auf Quercitrin berechnet 86
2.2.2.2. Untersuchungen mit Samen-Extrakten 87
2.2.2.2.1. Aufstellen d. typischen Farbkurven 87
2.2.2.2.2. Aufstellen der Eichkurven 98
2.2.2.2.3. Vergleichende Bestimmungen 98
2.2.2.3. Untersuchungen mit einer Mischung von Blatt- und Samen-Extrakten 99
2.2.3. Papierchromatographie 1o2
2.2.3.1. Untersuchung von Reinsubstanzen 1o2
2.2.3.2. Untersuchung von Blatt-Auszügen 1o2
2.2.3.3. Untersuchung von Samen-Auszügen 1o3

3. Diskussion 1o7
4. Zusammenfassung 11o
5. Literaturverzeichnis 112

Nachtrag 12o

1. Allgemeiner Teil.

1.1. Einleitung.

Die Verwendung von Drogen und ihren Zubereitungen für medizinische und somit auch pharmazeutische Zwecke ist in den letzten Jahren und Jahrzehnten zurückgegangen. Ein Blick in die neuesten Ausgaben der Arzneibücher zeigt, dass nur noch wenige Drogen und entsprechende galenische Zubereitungen aufgeführt sind. E i n Grund dafür mag sein, dass bei vielen Drogen Methoden der Wert- oder Gehaltsbestimmung noch unbekannt sind. Die Anerkennung der Phytotherapie und auch der Homöopathie setzt jedoch voraus, dass die verwendeten Arzneien den heutigen Anforderungen an gleichbleibende Wirkung, Standardisierung und Kontrollmöglichkeit entsprechen. Reproduzierbare Erfolge lassen sich nur mit gleichmässig wirkenden Mitteln erzielen.

Aus diesem Grunde ist es erforderlich, für alle arzneilich verwendeten Drogen und ihre Zubereitungen Methoden der Wert- und Gehaltsbestimmung auszuarbeiten. Das gilt besonders in Hinblick auf die Diskussionen, die seit Jahren über die Neubearbeitung des Deutschen Arzneibuches und des Homöopathischen Arzneibuches geführt werden.

Es gibt aber auch einige Drogen, die entgegen der oben erwähnten Entwicklung in den letzten Jahren immer mehr in den Vordergrund des medizinischen und somit auch pharmazeutischen Interesses gelangt sind. Zu diesen gehört die Rosskastanie, Aesculus Hippocastanum, deren Zubereitungen heute in einer grossen Zahl von Präparaten enthalten sind.

Spezielle Methoden zur Wert- und Gehaltsbestimmung der Rosskastanie und ihrer Zubereitungen sind jedoch nicht bekannt, sodass auch hier die oben aufgestellten Forderungen gelten. Desgleichen finden sich in der Literatur noch viele Widersprüche über die Wirk- und Inhaltsstoffe.

Es erschien daher wünschenswert, einen Überblick über die Art und Wirkung der Inhaltsstoffe der Rosskastanie zu geben, wie er sich aus den zum Teil widersprechenden Veröffentlichungen ergibt, und nach geeigneten Methoden zur Bestimmung der wirksamen Inhaltsstoffe zu suchen.

1.2. Geschichte.

Die Rosskastanie, Aesculus Hippocastanum, gehört zur Familie der Hippocastanaceen. Den Gattungsnamen "Aesculus" erhielt die Art von LINNÉ nach einer von römischen Schriftstellern bezeichneten Eichenart. Die Ableitung ist unsicher, wird aber häufig mit edere = essen in Zusammenhang gebracht (1). Der Ausdruck hippo = pseudo soll nach GRÄSER (2) in Verbindung mit castanus = Kastanienbaum die falsche, minderwertige, also nicht essbare Kastanie bezeichnen. Nach MORELOT (3) soll der Ausdruck "Ross"-kastanie daher rühren, dass die Hufschmiede in früheren Zeiten die Samen den Pferden gegen Husten eingegeben haben.

Die Heimat der Rosskastanie in geschichtlicher Zeit soll Nordgriechenland, der Kaukasus, die Türkei, Nordindien und Persien sein (1,4,5). Nach GRÄSER (2) sollen jedoch in Braunkohlenlagern fossile Reste von Kastanienbäumen gefunden worden sein, woraus geschlossen wird, dass der Baum schon in vorgeschichtlicher Zeit in Mitteleuropa heimisch gewesen sein muss und nur durch die vordringenden Eiszeiten nach Südosten verdrängt wurde.

Erst Mitte des 16. Jahrhunderts gelangte die Rosskastanie dann wieder nach Mitteleuropa. 1576 pflanzte ein kaiserlicher Hofgärtner die ersten Samen in Wien, die aus Konstantinopel dorthin gebracht worden waren. 1oo Jahre später kamen die ersten Samen nach Leipzig und 174o nach Basel (5). Heute ist der Baum als Zierpflanze über ganz Europa verbreitet. Nach MORELOT (3) soll jedoch die erste Rosskastanie in Paris bereits 1515 im Garten von Soubise gepflanzt worden sein.

1.3. Botanik.

Aesculus Hippocastanum ist ein stattlicher Laubbaum. Besonders auffallend ist die Form der Knospen, Blüten, Laubblätter und der Früchte.

Die dicken, kegelförmigen Knospen sind stark klebrig. Die schräg zygomorphen Blüten stehen in reichblütigen, steif aufrechten Rispen. Die fünf weissen bis rötlichen Kronblätter werden überragt von meist sieben aufwärts gekrümmten Staubblättern. Die Laubblätter sind 5-7 zählig gefingert und haben einen langen,

rinnigen Stiel. Die einzelnen Blättchen sind verkehrt eiförmig. Ihre Ränder sind kerbig gesägt.

Die Frucht ist eine gelbgrüne, weichstachelige, kugelige Kapsel und erreicht einen Durchmesser bis zu etwa 6 cm. In dieser Kapsel liegen meist zwei der kugeligen oder auch abgeflachten Samen, die von einer braunen, in frischem Zustand stark glänzenden Samenschale bedeckt sind. Dieser Glanz verschwindet während des Trocknens und der zunächst gelblich-weisse Nabelfleck nimmt eine hellbraune Farbe an. Nach Entfernen der Samenschale verbleibt das weisse Fleisch der Kotyledonen, das während des Trocknens etwas nachdunkelt und eine gelbliche Färbung annimmt.

Die Blütezeit des Baumes ist April und Mai. Die reifen Früchte fallen im Oktober an. Der Baum kann ein Alter bis zu 2oo Jahren erreichen.

Arzneilich verwendet werden hauptsächlich die reifen Samen.

Synonyma für den Samen sind : Rosskastanie oder auch Kastanie, Semen Hippocastani oder Semen Castaneae equinae (lateinisch), Marron d'Inde (franz.), Horsechestnut (engl.) (4).

1.4. Arzneibücher, Vorschriften, Handelspräparate.

1.4.1. DAB VI., Ergänzungsband und Nachträge.

Im DAB VI. und Ergänzungsband 6. sind die Rosskastanie und deren Zubereitungen nicht aufgeführt, auch nicht in den Nachträgen 1954 und 1959 DDR und im Nachtrag 1959 DBR.

1.4.2. Homöopathisches Arzneibuch.

Das HAB (6) versteht unter "Aesculus" die frischen, geschälten Samen. Die Essenz wird nach § 3 bereitet, wobei nach Bestimmung des Saftgehaltes mit der entsprechenden Menge Weingeist 8-1o Tage mazeriert, dann abgegossen und abgepresst wird. Nach SCHINDLER (7) beträgt der Saftgehalt meist 57-68 %. Der Arzneigehalt der Urtinktur beträgt 1/3.

Ausserdem führt das HAB noch "Aesculus Hippocastanum e floribus" auf, womit die frischen Blüten gemeint sind.

1.4.3. The Homoeopathic Pharmacopoeia of the USA (HPUS).

Die HPUS 1954 (8) gibt als Arzneigehalt der Urtinktur 1/1o an. Dabei ist zu berücksichtigen, dass hier als Einheit allgemein die getrocknete Pflanze festgelegt wird, wodurch die Einheitlichkeit des Arzneigehaltes aller Zubereitungen und Verdünnungen gewährleistet ist (9).

1.4.4. Vorschläge für das neue Deutsche HAB.

Die bisher erschienenen Vorschläge (9,1o,11,12) machen jedoch in absehbarer Zeit eine Änderung sowohl des speziellen Artikels Aesculus als auch der Vorschriften des § 3 HAB wahrscheinlich.

Hinsichtlich der Beschaffenheit der Aesculus-Urtinktur werden folgende Daten neu genannt : Dichte 0,9o5 - 0,92o, Trockenrückstand 7-8 %, pH 5,o - 5,5 (9, S.3o).

Unter Gehaltsbestimmung der Urtinktur wird ein hämolytischer Index von 8oo - 1ooo vorgeschlagen, wobei nach der Methode des Supplementum V. der Schweizer Pharmakopoe (13) gearbeitet wird, die auf BÜCHI, HIPPENMEYER und DOLDER zurückgeht. Diese Bestimmungsmethode wird auch für die Aufnahme in den allgemeinen Teil eines neuen HAB vorgeschlagen (1o).

Angaben über den Gehalt an Flavonoiden sind für ein neues HAB bisher nicht vorgesehen. Vielleicht wäre hier durch die Angabe eines Mindestgehaltes eine Lücke zu schliessen.

Bei der Tinkturbereitung im Sinne § 3 HAB wird in den Vorschlägen von der umständlichen Bestimmung des Saftgehaltes abgegangen. Dagegen wird eine Bestimmung der Trockensubstanz T_x vorgenommen, was durch Trocknen der zu verarbeitenden Droge unter definierten Bedingungen zu erfolgen hat. Dieser Wert (in Gew.%) ist mit dem Wert für die Normaltrockensubstanz T_N zu vergleichen, der bei dem jeweiligen Artikel angegeben ist. Für Aesculus wird T_N = 53 vorgeschlagen (12).

Liegt der Trockensubstanzgehalt T_x des zu verarbeitenden Pflanzenmaterials unter dem Wert für die Normaltrockensubstanz T_N, so ist das Frischpflanzenmaterial unbrauchbar und zu verwerfen. Keinesfalls darf solange getrocknet werden, bis T_N erreicht ist (11). (Die HPUS gestattet jedoch in entsprechenden

Fällen das Abdunsten des überschüssigen Feuchtigkeitsgehaltes). Ist T_x grösser als T_N, so sind an Hand der angegebenen Formeln die Mengen des für die Tinkturbereitung benötigten Weingeistes und Wassers zu berechnen.

1.4.5. Codex francais.

Im CF 1949 sind die frischen Samen aufgeführt (14, S.472).

Bei der Verarbeitung zu "Alcoholatura aesculi stabilisati" (14, S.32) werden diese geschält, in Stücke geschnitten und unter festgelegten Bedingungen mit Weingeist unter Rückflusskühlung gekocht. Der fertige Auszug ist eine "gelbe, klare Flüssigkeit von scharfem, brechenerregendem Geschmack".

Bei der Herstellung von "Extractum aesculi stabilisati" (14, S.31o) wird ähnlich verfahren, nur werden die Auszüge zuletzt zu einem dünnen Extrakt eingedampft.

Dieser wird zusammen mit Belladonnaextrakt zu "Suppositoria cum extractis belladonnae hippocastanique" (14, S.494) verarbeitet.

1.4.6. Übrige Arzneibücher.

Das Belgische Arzneibuch IV. lässt frische, ungeschälte Samen zur Tinkturbereitung verwenden. Diese werden ähnlich wie im CF angegeben unter Rückflusskühlung gekocht, jedoch unter Zusatz von 0,5 % Kalziumkarbonat. Für die fertige Tinktur wird ein Trockenrückstand von mindestens 7 % gefordert (15).

Auch im Codex medicam. nederl. II. ist eine "Alcoholatura Fruct. Aesculi Hippocast. stabilisat." aufgeführt (16).

Das Brasilianische Arzneibuch lässt "Extract. Aesculi Hippocast. fluid." herstellen durch Perkolation der gepulverten Baumrinde mit einer verdünnten Weingeistmischung. Die Rinde soll von 2- bis höchstens 3-jährigen Zweigen stammen (15).

Baumrinde und Samen sind auch im Arzneibuch von Portugal aufgeführt, ausserdem das Öl der Samen als "Oleum Hippocast. Seminum", zu dessen Gewinnung die Samen mit Äther extrahiert werden, worauf der Äther abgedampft wird (17).

1.4.7. Magistralformeln.

Die PRAESCRIPTIONES MAGISTRALES (PM) 1956 des Schweizerischen Apothekervereins bringen "Guttae Hamamelidis comp.", worin neben anderen Bestandteilen auch "Tinctura Hippocastani Fructus recentis" enthalten ist (18). Jedoch ist bei der Bezeichnung dieser Tinktur nach dem Kommentar zu den PM vermutlich ein Irrtum unterlaufen (16), da nicht die Früchte sondern die Samen verwendet werden. Das Gleiche gilt für das oben erwähnte Niederländische Arzneibuch, wie überhaupt bei Aesculus zwischen Früchten und Samen unterschieden werden muss. Laut Kommentar zu den PM darf die Frischdroge, also der Samen, nicht länger als zwei Wochen aufbewahrt werden. Die Tinktur ist vor Licht geschützt aufzubewahren, eine Forderung, die sonst in keiner Vorschrift gestellt wird. Eine Herstellungsvorschrift für die Tinktur wird jedoch nicht angegeben. Es wird nur die Verwendung der Alkoholatur des CF 1949 empfohlen.

1.4.8. Weitere Verwendungsvorschläge.

PEYER (19) empfiehlt die Verwendung von Samenauszügen zur Herstellung von Liquor Carbonis detergens an Stelle von Seifenrindenauszügen. Den gleichen Vorschlag soll nach v. CZETSCH-LINDENWALD (2o) auch WASICKY gemacht haben.

1.4.9. Handelspräparate.

Die Zahl der im Handel befindlichen Arzneispezialitäten, die Aesculus-Zubereitungen enthalten, ist gross. Eine Auswahl bringen GRÄSER (2) und HELWIG (21).

1.5. Inhaltsstoffe.

1.5.1. Allgemeine Inhaltsstoffe.

Die meist in jeder Pflanze anzutreffenden Inhaltsstoffe wie Stärke, Zucker, Fett und Eiweiss sind für die therapeutische und somit auch pharmazeutische Verwendung der Rosskastanie ohne Bedeutung. Ihrem Reichtum an diesen Stoffen verdanken die Kastanien jedoch, dass sie ein beliebtes Mittel zur Wildfütterung darstellen. Nur in Krisen- und Kriegszeiten hat man versucht, die Stärke und das Öl der menschlichen Er-

nährung zugänglich zu machen. In der Pharmazie sind die Stärke und das Öl bisher nicht gebraucht worden (2o). Das Portugisische Arzneibuch (17) bildet hier wohl eine Ausnahme.

Die Versuche zur Verwendung von Aesculus-Samen zur menschlichen Ernährung sind alt. Schon 1796 wurde ein Patent zur Stärkegewinnung aus ihnen erteilt. Auch während des letzten Krieges wurde in Deutschland hieran gearbeitet (5). Über entsprechende Verarbeitungsmethoden berichtet DIECKMANN (22). Hiernach liegt das Problem in der Entfernung des Saponins, das den bitteren Geschmack der Kastanien bewirkt. Zur Entfernung des Saponins mit dem Ziel der Stärkegewinnung werden nach DIECKmann zwei Methoden angewendet. Einmal die Extraktion mit Alkoholen, zum anderen die Extraktion mit verdünnten wässrigen Laugen oder wässrigen Alkalikarbonatlösungen. Hierbei wurde aus kostenmässigen Erwägungen dem zweiten Verfahren der Vorzug gegeben. Die gewonnene Stärke soll unbedenklich der menschlichen Ernährung zugeführt werden können.

Die mengenmässigen Angaben über die Bestandteile der Aesculus-Samen differieren sehr. Zunächst muss bei frischen Samen ein Wassergehalt von 43-54 % genannt werden (7).

KELLNER (23) hat für trockene, geschälte Samen ermittelt : Wasser 11 %, Protein 7 %, Fett 5,4 %, Kohlehydrate 72 % und Rohfaser 3 %.

KRÜGER (24) stellte folgende Mengen fest, bezogen auf die Trockensubstanz : 24-28 % Rohsaponin, 8-1o % Rohprotein, 5-7 % Öl, 2-3 % Rohfaser und 5o-6o % stärkehaltige Rückstände.

DEQUEKER (4) gibt im pharmakognostischen Kommentar zum Belgischen Arzneibuch folgende Werte an für ungeschälte, nicht getrocknete Samen : 1o % Saponin, 3o-4o % Stärke, 5,5 % Fett, 6 % Eiweiss, 2 % Zellulose, 5,5 % reduzierende Zucker und 1,3 % Asche.

Neuere Untersuchungen über Inhaltsstoffe und wirtschaftliche Verwendung stammen von ALEXA (25). Hier wird vorgeschlagen, das Öl zu extrahieren, dann das Saponin mit Alkoholen herauszulösen und schliesslich die Stärke fermentativ abzubauen. Als Gehalt werden angegeben : 1o-12 % Wasser, 7,4-8,1 % Öl, 26-28 % Saponin, 7,9-1o % Proteine, 37-38 % Stärke 2,8-3 %

Zellulose und 2,9 % Asche.

KAUFMANN und BALTES (26) geben den Fettgehalt der ungeschälten Samen mit 3,o-4,8 % an. Als Hauptfettsäuren wurden Ölsäure und Linolsäure gefunden.

SCHINDLER (27) nennt einige Kennzahlen für das Öl, die von STILLESEN sowie HALDEN und GRÜN stammen.

In Verbindung mit der therapeutischen Wirkung werden heute vier Stoffgruppen diskutiert, das Saponin, die Flavonoide, Kumarine und Aminopurine. Diese sollen in einem späteren Abschnitt ausführlicher besprochen werden.

Ausserdem müssen noch einige Inhaltsstoffe genannt werden, die zwar nur in geringen Mengen nachgewiesen wurden, aber als Provitamine und Vitamine doch physiologische Wirkungen ausüben.

WINDAUS und BOCK (28) fanden in lufttrockenen Samen 0,o12 % Phytosterine, davon 0,76 % eines Provitamins D.

DAM (29) hat in einem Gramm Trockensubstanz der Samen 8oo Einheiten Phyllochinon nachgewiesen.

SCHEUNERT und THEILE (3o) haben den Gehalt der Samen und Blätter an Ascorbinsäure bestimmt. Sie fanden in den Samen 24 mg% und in den Blättern 147 mg%.

HAENEL (31) hat mit Hilfe mikrobiologischer Methoden sämtliche Vitamine des B-Komplexes sowie Cholin und Methionin gefunden und mengenmässig bestimmt.

Cholin wurde auch von FIEDLER (32) in Samen, Blüten und Blättern sowie in galenischen Zubereitungen nachgewiesen. Die pharmakodynamischen Wirkungen des Cholins dürfen nach FIEDLER bei parenteraler Anwendung von Aesculus-Auszügen nicht übersehen werden.

In den Blättern sind von FIEDLER (32) auch deutliche Mengen von Katechingerbstoffen nachgewiesen worden. Diesen wird eine Gefässwirksamkeit zugeschrieben (33,34), worauf auch die therapeutische Anwendung von Blattextrakten als Injektionslösung hindeutet.

1.5.2. Inhaltsstoffe, die als Wirkstoffe diskutiert werden.

Zu diesen gehören das Saponin, die Flavonoide, Kumarine und Aminopurine. Während das Saponin schon lange als Wirkstoff gilt, werden die anderen genannten Gruppen erst seit einigen Jahren als Wirkstoffe diskutiert.

1.5.2.1. Saponin.

1.5.2.1.1. Chemie.

Saponine sind Pflanzenglykoside, die sich durch gemeinsame mehr oder weniger stark ausgeprägte besondere Eigenschaften auszeichnen : Hämolysewirkung, Oberflächenaktivität sowie Giftigkeit für Fische und Würmer (35).

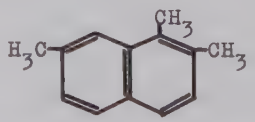
Das Aglykon wird als Sapogenin bezeichnet, bei Abspaltung nur eines Teiles der Zucker entstehen Prosapogenine.

Die ältere Einteilung in neutrale und saure Saponine wird heute als ungenau abgelehnt (35), wie auch eine exaktere Formulierung des Begriffes Saponin erwünscht ist (36).

Heute werden die Saponine auf Grund des Verhaltens ihrer Genine bei der Selen-Dehydrierung nach DIELS in zwei Gruppen eingeteilt (37).

1. Die früher als neutral bezeichneten C_{27}-Sapogenine ergeben hierbei den DIELS-Kohlenwasserstoff (17-Methylcyclopentenophenanthren), woraus die Zugehörigkeit dieser Gruppe zu den Steroiden und die Bezeichnung Steroid-Saponine hergeleitet wird.

2. Die früher als sauer bezeichneten C_{30}-Sapogenine ergeben bei der Selen-Dehydrierung hauptsächlich Sapotalin (1,2,7-Trimethylnaphthalin),



einen Kohlenwasserstoff, der auch aus verschiedenen Triterpenverbindungen erhalten worden ist (38).

Gleich den Triterpenen enthalten diese Sapogenine 30 C-Atome und folgen der Isoprenregel (35). Auf Grund dieser

Verwandschaft ist heute die Bezeichnung Triterpenoid-Saponine üblich.

Das Rosskastaniensaponin gehört der zweiten Gruppe an, was durch Untersuchungen von RUZICKA und VAN VEEN durch Selen-Dehydrierung festgestellt wurde (39). Diese Arbeiten bilden den Ausgangspunkt der modernen Triterpenoidchemie (35).

Infolge der leichten Zugänglichkeit der Aesculus-Samen ist ihr Saponin schon häufig Gegenstand von Untersuchungen gewesen. Jedoch zeigen die Ergebnisse der älteren Autoren grosse Unterschiede. WINTERSTEIN (4o), der diese Arbeiten zusammenstellt, führt dieses darauf zurück, dass den Untersuchern nicht immer einheitliche Substanzen sondern Gemische verschiedener Prosapogenine vorgelegen haben. Daraus erklären sich auch die verschiedenen Bezeichnungen für Aesculus-Saponin wie Argyräscin, Aphrodäscin, Methylaphrodäscin, Teläscin, Äsculinsäure und Äsculininsäure (41,42), die zwar älteren Arbeiten entstammen, jedoch auch teilweise heute noch verwendet werden (5,43).

Die Bezeichnung "wasserlösliche Äsculinsäure" und "wasserunlösliche Äsculininsäure" für Aesculus-Saponin, die sich auch heute noch findet (5,43), geht auf MASSON (44) zurück. Eine Verwechselung mit dem gleichfalls in Aesculus Hippocastanum vorkommenden Kumarinderivat Aesculin ist leicht möglich (45,86).

In der neueren Literatur scheint sich der Vorschlag VAN DER HAAR's durchgesetzt zu haben, das vermeintliche Saponingemisch der Rosskastanie als Aescin zu bezeichnen (46). Jedoch spricht VAN DER HAAR noch von einem wasserlöslichen und einem wasserunlöslichen Aescin. Für das Genin gibt er die Summenformel $C_{21}H_{36}O_4$ an (41). Auch wird von diesem Autor erstmals das Vorkommen von Essigsäure als Spaltprodukt erwähnt (47).

Als erster dürfte ROCHLEDER 1867 das Sapogenin in Händen gehabt haben, dem er die Summenformel $C_{24}H_{4o}O_4$ zuschrieb (48).

WINTERSTEIN (4o) spricht erstmals beim "Aescigenin" von einer pentacyclischen Verbindung und erwähnt die Abspaltung von Tiglinsäure. Als Summenformel gibt er $C_{35}H_{58}O_7$ an. Jedoch ist durch spätere Untersuchungen festgestellt worden, dass WINTERSTEIN's "Aescigenin" kein einheitlicher Stoff gewesen ist (49,5o).

Neuere Arbeiten mit dem Ziel der Strukturaufklärung des "Aescigenins" sind von RUZICKA und seiner Schule durchgeführt worden.

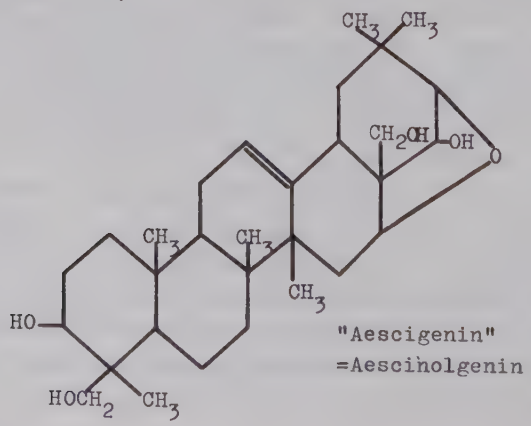
RUZICKA, JANETT und REY (49) bestreiten das Vorkommen von Tiglinsäure und erwähnen erstmals das Vorkommen einer äusserst reaktionsträgen Ketogruppe und einer nicht hydrierbaren Doppelbindung im "Aescigenin"molekül.

Auch RUZICKA, BAUMGARTNER und PRELOG (51) konnten keine Tiglinsäure als Spaltstück fassen und stellten als Summenformel für "Aescigenin" $C_{30}H_{48}O_5$ auf. Die Funktion der Sauerstoffatome wurde von den Autoren geklärt und "Aescigenin" als ein "einfach ungesättigter, pentacarbocyclischer, vierwertiger Triterpenalkohol mit einem zusätzlichen Oxydring" bezeichnet. Für die OH-Gruppen wurde wahrscheinlich gemacht, dass je zwei dieser Gruppen in 1,2- oder 1,3-Stellung zueinander stehen.

In einer weiteren Arbeit (52) haben die gleichen Verfasser die Lage des Oxydringes als Gruppe $-CH_2-O-$ zwischen C-19 und C-21 wahrscheinlich gemacht, wobei die CH_2-Gruppe an C-19 gebunden sein soll.

Die aus den letzten beiden Untersuchungen (51,52) resultierende Strukturformel hat Eingang in die neuere Literatur gefunden (35).

Fortgeführt wurden diese Untersuchungen durch CAINELLI, JEGER und Mitarbeiter, die 1957 für "Aescigenin" folgende Struktur aufstellten (53),



"Aescigenin"
=Aescinolgenin

die dem letzten Wissensstand entspricht und die Konstitutionsermittlung des "Aescigenins" zum Abschluss bringt, das jetzt entgegen der bisherigen Ansicht (35) der ß-Amyrin-Gruppe zugerechnet werden muss. (Die Verfasser (53) bringen die vorstehende Formel als Stereoformel.)

Jedoch räumen die Autoren (53) die Möglichkeit ein, dass das "Aescigenin" in der von ihnen untersuchten Form nicht das genuine Aglykon des Aescins darstellt, wobei jedoch nicht an die Tiglinsäure gedacht wird, die 1956 von RÖMISCH (5o) erneut ins Gespräch gebracht wurde. Berücksichtigt man die Arbeiten von MERKEL (54,58) und RÖMISCH (5o,57), auf die noch eingegangen wird, so müsste das "Aescigenin" von CAINELLI, JEGER und Mitarbeitern (53) eigentlich als "Aescinolgenin" bezeichnet werden. Das Gleiche gilt für die erwähnten Arbeiten von RUZICKA und Mitarbeitern. Ein "Aescigenin" zu gewinnen, bei dem zwar im Sinne der Genin-Definition sämtliche Zucker abgespalten sind, die übrigen Gruppen jedoch erhalten bleiben, ist bisher, auch bei eigenen Untersuchungen, nicht gelungen. Zwangsläufig wird bei der Zuckerabspaltung durch Hydrolyse die von RÖMISCH (5o) erwähnte "hämolytische Gruppe" gleichfalls abgespalten, sodass als Produkt stets das Genin des Aescinols erhalten wird. Hier bliebe durch enzymatische Abspaltung der Zucker noch eine Lücke zu schliessen.

Auch ist die Frage nach der Existenz mehrerer Aesculus-Saponine, von MASSON (44) und VAN DER HAAR (46,47) behauptet, inzwischen entschieden. Bei papierchromatographischen Untersuchungen haben FIEDLER (55) und RÖMISCH (5o) nur e i n Saponin gefunden, was durch eigene papierchromatographische Untersuchungen bestätigt wurde. Auch in den erwähnten Arbeiten aus der Schule von RUZICKA ist nur von e i n e m Saponin die Rede. Es muss jedoch unterschieden werden zwischen dem nativen Saponin, wie es in der Pflanze vorliegt, und der als Aescin bezeichneten freien, kristallisierten Saponinsäure. Hierauf wird später noch näher eingegangen.

Über den Zuckeranteil des Aescins haben sich JERMSTAD und WAALER (56) geäussert, wobei Glukose, Xylose und Glukuronsäure genannt wurden. RÖMISCH (57) fand jedoch später, dass die Xylose erst sekundär durch Dekarboxylierung aus Glukuronsäure

entstanden war und nennt als Zuckeranteil zwei Moleküle Glukose und ein Molekül Glukuronsäure. Dabei soll die Glukuronsäure die sauren Eigenschaften des Aescins und des noch zu besprechenden Aescinols bewirken.

Durch Verseifung des von MERKEL (54) gewonnenen Aescins hat RÖMISCH (5o) Tiglinsäure und Essigsäure im molekularen Verhältnis erhalten, wodurch die Angaben WINTERSTEIN's und VAN DER HAAR's neuerdings bestätigt wurden. Das nach der Abspaltung beider Säuren verbleibende Restmolekül, wobei die Zucker unversehrt bleiben, nennt RÖMISCH "Aescinol". Dieses wurde zwar vorher schon als Kaliumsalz von MERKEL (58) dargestellt, jedoch für ein Prosapogenin gehalten. Die Frage, bereits von WINTERSTEIN angeschnitten, ob die Tiglinsäure primär im Aescinmolekül vorliegt, oder erst sekundär durch Wasserabspaltung aus α-Methyl-ß-oxybuttersäure entstanden ist, wird von RÖMISCH durch die Annahme entschieden, dass im Aescinmolekül eine α-Methyl-ß-azetoxybuttersäure-Gruppe vorliegt, womit gleichzeitig Aussagen über die Bindung der gefundenen Essigsäure gemacht werden.

Da diese Gruppe besonders leicht im alkalischen Medium abgespalten wird, ist sie von RUZICKA (49) bereits durch die einen Monat dauernde alkalische Mazeration des Samenmehles entfernt worden, sodass nur das für Aescin gehaltene Aescinol zur Untersuchung vorgelegen hat (5o).

Da das Aescinol keine hämolytischen Eigenschaften mehr besitzt (5o), entsteht die Frage, ob diese Verbindung überhaupt noch zu den Saponinen zu rechnen ist. Die hämolytische Aktivität des Aescins ist also abhängig von der Unversehrtheit des Moleküls in Hinsicht auf die Bindung der beiden vorstehend bezeichneten Säuren. RÖMISCH (5o) spricht in diesem Zusammenhang von der "hämolytisch wirkenden Gruppe" des Aescins.

Hinsichtlich der Frage, in welcher Form das Aescin in der Pflanze vorliegt, bleiben noch einige Probleme offen. RÖMISCH (5o) nahm zunächst auf Grund des von ihm beobachteten gleichen Verhaltens bei papierchromatographischen Untersuchungen an, dass das Aescin nach MERKEL, also die freie kristallisierte Saponinsäure, identisch sei mit dem in der Pflanze vorliegen-

den nativen Aesculus-Saponin. Später machte der gleiche Autor (59) jedoch auf Grund der verschieden starken hämolytischen Wirkung einen Unterschied zwischen diesen beiden Stoffen. Auch MERKEL (54) unterscheidet zwischen Aescin und dem nativen Saponin und nimmt an, "dass das kristallisierbare saure Rosskastaniensaponin (Aescin) im Drogenmaterial an andere, indifferente Gruppen zum nativen Saponinkomplex gebunden vorliegt" und durch eine milde Säurehydrolyse, vermutlich unter geringer Strukturänderung, abgeschieden werden kann.

Ähnlich äusserten sich kürzlich auch BRIESKORN und HERRIG (6o) auf Grund von Untersuchungen mit dem Aescin ähnlichen pentacyclischen Triterpenoiden, wobei von einer "Bindung an einen wasserlöslich machenden Stoff, der aber ausserordentlich leicht abspaltbar sein muss" gesprochen wird. Durch diese Bindung soll dann erst der Transport der schwerlöslichen Triterpenoide durch den Saftstrom der Pflanze ermöglicht werden.

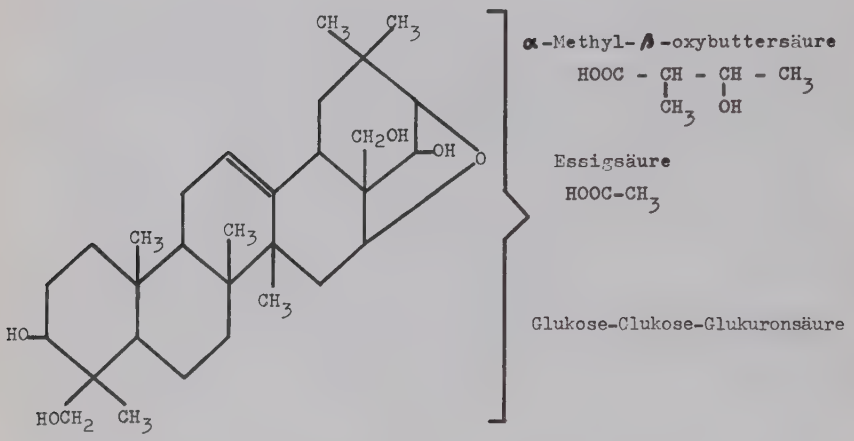
Zusammenfassend kann zum Aufbau des Aesculus-Saponins gesagt werden, dass noch einige Fragen ungeklärt sind, wie die Bindung des Aescins im nativen Saponinkomplex an einen wasserlöslich machenden Rest sowie die Verknüpfung der α-Methyl-ß-oxybuttersäure und der Essigsäure.

Als eigener Beitrag zu den angeschnittenen Problemen soll hier erwähnt werden, dass die Tiglinsäure als Bestandteil des Aescinmoleküls ausgeschlossen werden kann. Beim Vergleich der IR-Spektren+ von Aescin und Tiglinsäure fällt auf, dass die Bande der C=C Transdoppelbindung bei 1o,35 μ im Spektrum der Tiglinsäure beim Spektrum des Aescins fehlt. Die Tiglinsäure kann also nur ein sekundäres Produkt beim Abbau des Aescins sein.

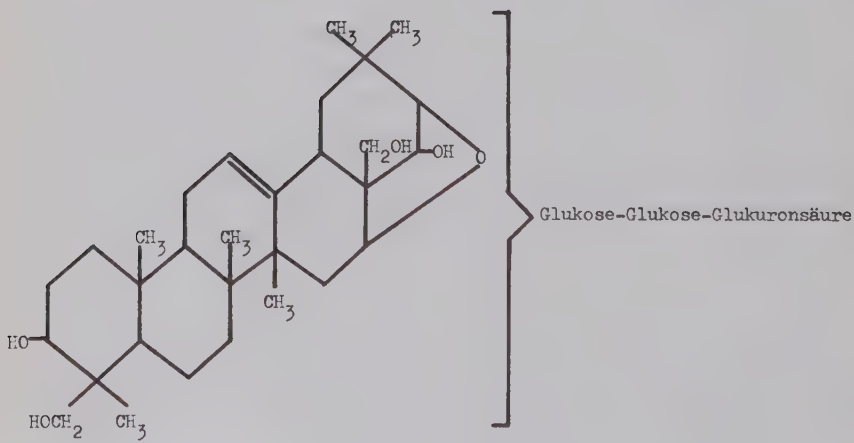
Die Unterscheidung zwischen Aescin und nativem Saponin ist berechtigt, denn bei eigenen papierchromatographischen Untersuchungen wurde ein bisher nicht beschriebenes unterschiedliches Verhalten beider Stoffe festgestellt. Unter gleichen Bedingungen ergab reines Aescin höhere R_F-Werte als das native Saponin der Samenauszüge.

+Herrn Dr. Maennchen in Fa. E. Leitz/Wetzlar sei für die Aufnahme der IR-Spektren herzlich gedankt.

Unter Berücksichtigung der neuesten Ergebnisse kann folgender Aufbau für Aescin und Aescinol angenommen werden :



A e s c i n



A e s c i n o l

1.5.2.1.2. Vorkommen in Aesculus Hippocastanum.

Den grössten Gehalt an Saponin besitzen die Samen, vornehmlich die Kotyledonen. Daneben wurde papierchromatographisch auch in der Samenschale, der Fruchtschale, den Blättern und Blattstengeln sowie in der Rinde Saponin nachgewiesen (61).

1.5.2.1.3. Gewinnungsmethoden.

1.5.2.1.3.1. Allgemeine Methoden.

Ein Grund für die sich in der Literatur findenden unterschiedlichen Angaben über die Eigenschaften insbesondere über die hämolytischen Wirkungen des Aesculus-Saponins liegt darin, dass den jeweiligen Untersuchern keine einheitlichen sondern mehr oder weniger verunreinigte Substanzen vorgelegen haben. Die bislang üblichen Gewinnungsmethoden reichten nicht aus, die Begleitstoffe wie Zucker, Stärke oder Flavonoide zu entfernen oder das Saponin in reiner Form abzuscheiden. Selektive Lösungsmittel waren nicht bekannt. Es wurden mehr oder weniger stark braun gefärbte Substanzen gewonnen, die sich durch starke Hygroskopizität auszeichneten, ähnlich dem früher im Handel befindlichen "Rosskastaniensaponin MERCK", das auch von AWE und HÄUSSERMANN (62) für ihre Untersuchungen verwendet wurde.

Die älteren Methoden der Barium- oder Bleifällung, nach denen schon ROCHLEDER gearbeitet hat, sind mit Recht heute ausser Gebrauch gekommen (35). VAN DER HAAR und WINTERSTEIN versuchten, die Zucker durch Dialyse zu entfernen. RUZICKA und Mitarbeiter mazerierten zunächst einen Monat lang mit wässrigen Alkalien, wodurch wiederum kein intaktes Aescin gewonnen werden konnte (S.18). Die neueren Handbücher (35) beziehen sich hinsichtlich der Aescin-Gewinnung hauptsächlich auf WINTERSTEIN.

1.5.2.1.3.2. Patentierte Verfahren.

Ein älteres Patent (63) bedient sich zunächst der erwähnten Bleifällung und lässt dann das Saponin mit Äther ausfällen.

BOEDECKER (64,65) versucht, ein Verkleben des allerdings wenig reinen Saponins durch Bindung an einen Trägerstoff zu

verhindern, wobei Derivate des 8-Oxychinolins (64) und Aluminiumoxyd (65) verwendet werden. Ein weiteres Patent von BOEDECKER (66) lässt einen Rohextrakt im Gegenstromverfahren mit Methylaethylketon extrahieren.

Durch Arbeiten von MERKEL (54,67) wurden Verfahren bekannt, die erstmals die Gewinnung reinen, kristallisierbaren Aescins gestatteten, das auch einen definierten Schmelzpunkt besass.

Nach einem weiteren Verfahren (58) dachte MERKEL, ein Prosapogenin zu gewinnen, was sich jedoch später als Irrtum herausstellte (5o). Es wurde dagegen das Kaliumsalz eines bislang nicht beschriebenen Spaltstückes gewonnen, dessen Säureform später von RÖMISCH als Aescinol bezeichnet wurde (5o).

An Ausbeuten bei den beiden sich ergänzenden Verfahren zur Aescin-Gewinnung (54,67) gibt MERKEL zusammen 4,5 % an, bezogen auf das entfettete Mehl getrockneter Samen. Diese Ausbeuten konnten jedoch bei eigenen Untersuchungen nicht erreicht werden, während MERKEL's Ausbeuten bei Aescinol-Kalium in Höhe von 3,3 % geringfügig überschritten wurden.

In der Literatur wird der Saponingehalt der Aesculus-Samen in der Regel zu hoch angegeben (59), wobei Zahlen von 24-28 % genannt werden (24). Dieses mag daher rühren, dass es bislang nicht möglich war, reine einheitliche Substanzen zu gewinnen.

1.5.2.1.4. Bestimmungsmethoden.

STEINER und HOLTZEM berichten (35) :"Quantitative chemische Methoden der Saponinbestimmung gibt es nicht."

Versuche zur präparativen quantitativen Isolierung und gravimetrischen Bestimmung der Substanzen sind stets mit erheblichen Verlusten verbunden und mit einer beträchtlichen Fehlerbreite behaftet.

Die heute üblichen Bestimmungsmethoden beruhen auf den bereits erwähnten Eigenschaften der Saponine : 1. auf der hämolytischen Wirkung, 2. auf der Giftigkeit für Fische, Würmer und Froschlarven und 3. auf der Oberflächenaktivität.

1. Die Bestimmung des hämolytischen Index hat von allen Methoden der Saponinbestimmung die grösste Bedeutung erlangt, was sich schon in einer umfangreichen Literatur

äussert, von der einige Zusammenstellungen erwähnt werden sollen (35,68,69,62,7o,71).
Der hämolytische Index ist ein Ausdruck für die Anzahl Milliliter Blutkörperchenaufschwemmung, die von 1 g eines Saponins, einer Droge oder Zubereitung vollständig hämolysiert wird. Die vorher "deckfarbene" d.h. undurchsichtige Blutkörperchenaufschwemmung wird nach Eintritt der Hämolyse "lackfarben", also durchsichtig.
Bei Durchführung dieser Bestimmung sind genau festgelegte Bedingungen einzuhalten, die auf pH-Wert, Art des Blutes, Temperatur und Isotonie Rücksicht nehmen müssen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.
Es ist immer wieder versucht worden, die Genauigkeit dieser Methode zu steigern so z.B. von FINHOLT (72) durch Einschaltung einer photometrischen Hämoglobinbestimmung, die Methode zu standardisieren oder wohldefinierte Bezugssubstanzen wie Desoxycholsäure oder ein Standardsaponin einzuführen (71,13). Trotzdem haften dem Verfahren alle Fehlerquellen einer biologischen Methode an.
Dazu kommt noch, dass neuerdings festgestellt wurde (59), dass reines Aescin andere hämolytische Eigenschaften besitzt als das native Aesculus-Saponin. Hierdurch wird die Anwendung der Hämolyse zur Saponinbestimmung bei Aesculus-Samen oder deren Zubereitungen erst recht problematisch. Die Ausarbeitung einer quantitativen chemischen Bestimmungsmethode erschien daher wünschenswert.

2. Die Giftigkeit für Fische und Kaulquappen ist von KOFLER (69) und KOBERT (42) eingehend beschrieben. Die Bestimmung eines "Fischindex" hat sich jedoch nicht durchsetzen können (35).
Das Gleiche gilt für die Bestimmung der DL 5o mit saponinhaltigen Auszügen an Tubifex-Würmern nach SCHEIDEGGER (73).
Neuerdings beschreiben KARMA und v. SCHANTZ das "Xenopus"-Verfahren, das die Giftwirkung der Saponine gegen Froschlarven ausnutzt (74).

3. KOFLER (69) verwendete zur Bestimmung der Oberflächen-

spannung das Stalagmometer nach TRAUBE, während AWE und HÄUSSERMANN (62) das Stagonometer nach TRAUBE benutzten, ein Unterschied, der in der Literatur nicht immer beachtet wird (68). Es konnte eine gewisse Proportionalität zwischen Oberflächenaktivität und hämolytischer Aktivität bei der Untersuchung von wässrigen Aesculus-Samenauszügen festgestellt werden. Später ist auf Grund dieser Untersuchungen eine Diskussion über die Begriffe "statische" und "dynamische" Oberflächenspannung entbrannt (75,76).

Bei Bestimmung der von APT (77) empfohlenen "Schaumzahl" wird unter definierten Bedingungen in wässrigen Saponinlösungen ein Schaum erzeugt. Die Methode ist umstritten (35).

JERMSTAD und WAALER (78) messen durch tropfenweisen Zusatz einer organischen Inhibitionsflüssigkeit die Hemmung des Schaumvermögens.

SCHULTZ und BARTHOLD (79) beschreiben eine photometrische Bestimmungsmethode, die auf der Adsorption von Farbstoffen an Saponine beruht, eine Methode, die sich aber nicht durchsetzen konnte.

Während der Durchführung der vorliegenden Untersuchungen erschien eine Arbeit von RÖMISCH (59), worin das Saponin von Aesculus-Auszügen zunächst in wasserunlösliches Aescinol überführt wurde. Der Aescinol-Niederschlag konnte dann gravimetrisch oder alkalimetrisch bestimmt werden. Durch Umrechnung wurde der Gehalt der untersuchten Auszüge auf Aescin bezogen. Weitere Erfahrungen über diese an sich einfache Methode liegen nicht vor.

1.5.2.2. Flavonoide.

1.5.2.2.1. Vorkommen in Aesculus Hippocastanum.

Das Vorkommen von Flavonoiden in Aesculus Hippocastanum ist seit längerer Zeit bekannt (8o). Auf ihre Bedeutung für die Wirkung von Aesculus-Auszügen wurde jedoch erst in den letzten Jahren hingewiesen (55,81).

ROCHLEDER (8o) nennt Quercitrin als Bestandteil von Samen, Blättern und Blüten. Diese Ansicht hat sich lange gehalten (82, 83) und findet sich auch noch bei SCHINDLER (7). Erst in den

letzten Jahren durchgeführte papierchromatographische Untersuchungen in Verbindung mit einer präparativen Isolierung haben hier eine Klärung gebracht. So muss Quercitrin als Bestandteil der Samen und Blüten gestrichen werden (27).

1.5.2.2.1.1. Samen.

Die endgültige Klärung der Frage, welche Flavonoide in den Samen vorliegen, steht noch aus, jedoch wird hieran von berufener Seite gearbeitet (32). Die bisher vorliegenden Veröffentlichungen sprechen von Bi- und Triosiden des Quercetins und Kämpferols (55,81,32,84). Die Identität dieser beiden Aglykone wurde nach Hydrolyse der genuinen Glykoside durch Schmelzpunkt, Mischschmelzpunkt, papierchromatographische Vergleiche und Aufnahme der UV-Spektren sichergestellt (32). Ausserdem wird hier die Gegenwart eines dritten, noch unbekannten Aglykons als wahrscheinlich bezeichnet. Quercitrin als Samenbestandteil wurde jedoch nicht gefunden (55).

Von anderer Seite (61) wird Rutin als Samenflavonoid wahrscheinlich gemacht.

1.5.2.2.1.2. Blätter.

Die abschliessenden Arbeiten über die Aufklärung der aus den Blättern isolierten Flavonoide wurden kürzlich von HÖRHAMMER (81) veröffentlicht. Hiernach enthalten die Blätter zur Hauptsache Quercitrin, ausserdem in geringerer Menge Kämpferol-3-arabinosid und Quercetin-3-glukosid und in sehr geringer Menge Rutin und Kämpferol-3-rhamnoglukosid. Kämpferol-3-arabinosid war bislang als Naturstoff unbekannt.

FIEDLER (32) nannte bereits einige Jahre vorher die gleichen Stoffe, machte jedoch keine experimentellen Angaben.

1.5.2.2.1.3. Blüten.

HÖRHAMMER (81) bringt auch die abschliessende Bestimmung der Blütenflavonoide. Als Hauptglykosid der Blüten erwies sich Kämpferol-3-glukosid. In geringerer Menge wurden gefunden : Kämpferol-3-arabinosid, Kämpferol-3-rhamnoglukosid, Quercetin-3-glukosid und Rutin.

Auch hier werden die Angaben von FIEDLER (32) bestätigt.

1.5.2.2.2. Chemie.

Die genannten Flavonoide gehören sämtlich zur Gruppe der Flavonolglykoside, deren Aglykone, die Flavonole, sich von den Flavonen ableiten.

Grundkörper ist das γ-Pyron (I) (38), das als Benzo-γ-pyron (II), auch Chromon genannt, an C-2 oder C-3 substituiert sein kann. Bei Phenylsubstitution an C-2 entsteht das Flavon (III), an C-3 das Isoflavon (V). Wird die Doppelbindung des Flavons zwischen C-2 und C-3 hydriert, so entsteht das Flavanon (VI). Das Flavonol (VII) ist ein an C-3 hydroxylsubstituiertes Flavon. Analog hierzu gibt es ein Flavanonol (VIII), auch Flavanol genannt, ein 3-Oxyflavanon.

Ähnlich gebaut ist das Flavan (IV), auch Katechin genannt, das jedoch keinen γ-Pyron-Ring enthält. Verwandschaft besteht ferner zum Chalkon (Benzalazetophenon) (IX), das als Oxychalkon (Oxybenzalazetophenon) Bedeutung für den Abbau (Konstitutionsermittlung) und die Synthese des Flavons und seiner Derivate gewonnen hat (38,85), Untersuchungen, die zur Hauptsache auf v. KOSTANECKI (38,85,86) zurückgehen.

Eine Übersicht über die genannten Verbindungen gibt die Aufstellung auf S. 27.

Auch Aesculin und Aesculetin (S.31) können hier erwähnt werden, da diese Kumarinderivate auch ein Benzopyrongerüst besitzen, das aber im Gegensatz zu den Flavonoiden einen α-Pyron-Ring enthält (86).

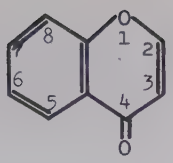
Die Substitution der H-Atome am Chromon-Ring oder am Phenylrest des Flavonols lässt eine grosse Anzahl von Verbindungen möglich werden. Ausserdem kommen in der Natur die Flavonoide meist als Glykoside vor, wobei verschiedene Zucker und auch verschiedene Stellungen der Verknüpfung beobachtet wurden.

Die Flavonole aus Aesculus Hippocastanum leiten sich vom Quercetin und Kämpferol ab und kommen ausschliesslich als Glykoside vor, wobei die Zuckerreste stets in Stellung-3 sitzen. Eine Übersicht bringt die Aufstellung auf S.28.

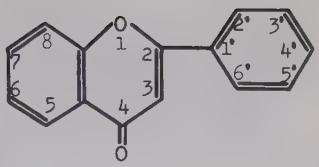
Von physiologischer Bedeutung ist das Redoxpotential der Flavonole. Entsprechende Umwandlungen sollen nach KÜHNAU (88) auch in der lebenden Zelle erfolgen.

I

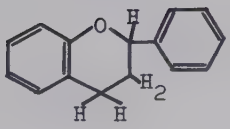
γ-Pyron

II 

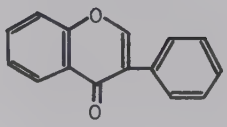
Benzo-γ-pyron
(Chromon)

III 

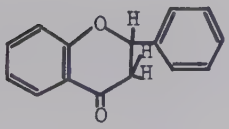
Flavon

IV 

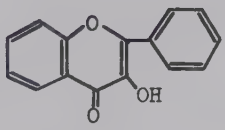
Flavan
(Katechin)

V 

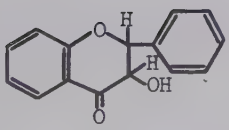
Isoflavon

VI 

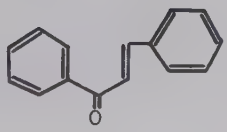
Flavanon

VII 

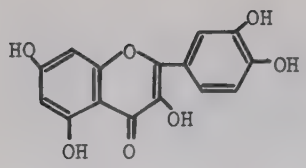
Flavonol

VIII 

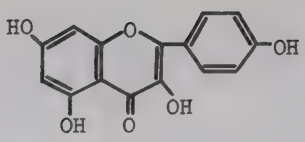
Flavanonol

IX 

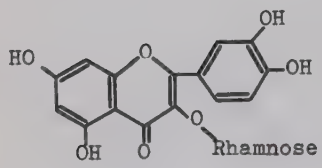
Chalkon



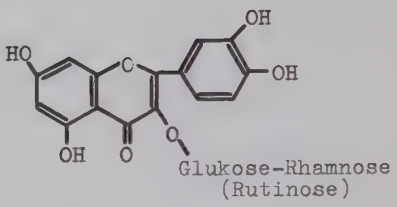
Quercetin



Kämpferol



Quercitrin



Rutin

1.5.2.2.3. Qualitative Nachweise.

Einige qualitative Flavonoidnachweise für homöopathische Zubereitungen von Aesculus-Samen werden von SCHINDLER (7) genannt und zum Teil für ein neues HAB vorgeschlagen (9). Von diesen soll hier nur die Cyanidinreaktion nach WILLSTÄTTER (89) erwähnt werden, die auch als Nachweis für Rutin in den 3. Nachtrag (1959) zum DAB VI. aufgenommen wurde (9o). Beim Behandeln von Rutinlösungen oder niederen homöopathischen Potenzen von Aesculus Hippocastanum mit Zink oder Magnesium in salzsaurer Lösung nimmt die ursprünglich gelbliche Lösung eine rote Färbung an. Es entstehen reduktiv und unter Abspaltung der Zuckerreste die entsprechenden Anthocyanidinchloride, aus Quercetinderivaten (Rutin) Cyanidinchlorid und aus Kämpferolderivaten Pelargonidinchlorid.

Diese Reaktion kann auch zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung benutzt werden (91), wie umgekehrt die noch zu besprechenden quantitativen Methoden auch qualitativ angewandt werden können.

Zum Nachweis bestimmter Flavonoide kann man sich auch de-

ren konstitutionell bedingte Eigenschaft zu Nutze machen, mit einigen farblosen Metall- oder Metalloidverbindungen infolge Chelatbildung eine deutliche Bathochromie zu geben. Von den Metallen werden Salze des Aluminiums, Thoriums, Bleis, Zirkons, Cadmiums, Kupfers und Eisens genannt; als Metalloide Verbindungen von Bor, Antimon und Wismut (92).

1.5.2.2.4. Quantitative Nachweise.

1.5.2.2.4.1. Metallkomplexe.

Mit einigen Salzen der genannten Metalle sind auch Untersuchungen zur quantitativen photometrischen Flavonoidbestimmung durchgeführt worden, so mit Verbindungen des Aluminiums (93, 94,95,96), Zirkons (93,97) sowie des Cadmiums und Kupfers (93).

Bei Verwendung von Aluminiumsalzen ist jedoch das Arbeiten in einer Pufferlösung erforderlich, deren pH-Wert der Beständigkeit des Aluminiumkomplexes des jeweils zu bestimmenden Flavonoids angepasst sein muss. In saurer Lösung sind nicht alle Komplexe stabil; in alkalischer Lösung wird eine Trübung infolge der Bildung von Aluminiumhydroxyd entstehen, wodurch eine photometrische Bestimmung unmöglich gemacht wird. Bei flavonoidhaltigen Pflanzenauszügen, deren Flavonoide nicht bekannt sind und nicht als Reinsubstanzen vorliegen sowie hinsichtlich der Stabilität des Aluminiumkomplexes nicht geprüft werden können, treten schwer übersehbare Schwierigkeiten auf, die das Bestimmungsverfahren komplizieren.

1.5.2.2.4.2. Borkomplexe.

Auf Grund einer Mitteilung von HÖRHAMMER und Mitarbeitern (98), die einen Borkomplex "zum Nachweis für Flavonole in nicht gereinigten Pflanzenauszügen" für sehr zweckmässig hielten, soll hier das Verhalten einiger Flavonol-Bor-Komplexe besonders untersucht werden.

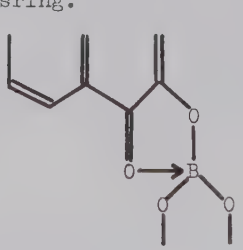
1.5.2.2.4.2.1. WILSON-TAUBÖCK Test.

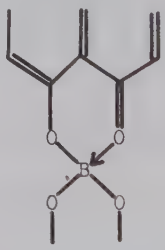
Die Verwendung von Borverbindungen zum Nachweis von Flavonoiden geht auf WILSON (99) zurück. Dieser nahm Borsäure und Zitronensäure und erzeugte mit diesen Stoffen eine Bathochromie in azetonigen Flavonollösungen. Die entstandene Färbung

war jedoch sehr wasserempfindlich. Das Gleiche gilt für eine Reaktion, die HÖRHAMMER und Mitarbeiter mit Borsäure und Quercetin sowie Rutin ohne die Anwesenheit von Zitronensäure erhalten haben (97,98).

TAUBÖCK hat in der Reaktion nach WILSON die Zitronensäure durch Oxalsäure ersetzt und auch Malonsäure als brauchbar angegeben (1oo). Über den Mechanismus dieser Reaktion und die Struktur der entstehenden Verbindungen haben HÖRHAMMER und Mitarbeiter Untersuchungen durchgeführt (98,1o1,1o2).

Danach gilt für das zur Reaktion zu bringende Flavonoid zunächst die Voraussetzung, dass eine der Chelierung fähige Substituentenkonstellation vorhanden sein muss. Das heisst, dass in α- oder ß-Stellung zur Ketogruppe des γ-Pyron-Ringes sich eine veresterbare Hydroxylgruppe befinden muss. Dem als LEWIS-Base wirkenden Keto-Sauerstoff des Flavonoids steht als LEWIS-Säure das durch den Einfluss der komplexbildenden Säure (beim TAUBÖCK-Test Oxal- oder Malonsäure, beim WILSON-Test Zitronensäure) positivierte Bor gegenüber. Es entsteht ein spiranartiger Komplex mit Bor als Zentralatom. Je nach Stellung der Hydroxylgruppe zum Keto-Sauerstoff (α oder ß) entsteht ein Fünf- oder Sechsring.





HÖRHAMMER und Mitarbeiter stellten fest, dass sich beim TAUBÖCK-Test auf Quercetin je ein Molekül Borsäure, Malonsäure und Quercetin unter Bildung des bathochromen Komplexes miteinander verbinden.

1.5.2.2.4.2.2. Tetraphenyl-diboroxyd. $(C_6H_5)_2$ =B-O-B= $(C_6H_5)_2$

Ein neues Reagenz zur elektrophilen Boraddition an chelierende Gruppen wurde als Tetraphenyl-diboroxyd vor einigen Jahren von NEU (1o3) beschrieben. Durch den Einbau des Bors in

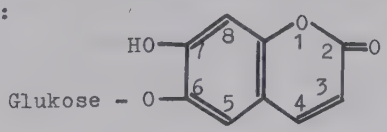
eine organische Verbindung fällt die umständliche Verwendung mehrerer Chemikalien wie beim WILSON- und TAUBÖCK-Test fort. Das Arbeiten mit Pufferlösungen und wasserfreien Lösungsmitteln wie bei der Verwendung von Metallsalzen ist nicht erforderlich. Die entstehenden Farbtönungen sind stabil gegen Säuren und Wasser.

Obwohl NEU (1o4) angab, dass Tetraphenyl-diboroxyd "recht beständig" sein soll, ist die Verbindung jedoch inzwischen wegen zu geringer Haltbarkeit aus dem Handel gezogen worden (1o5). Statt dessen wird vom gleichen Hersteller unter dem Namen "Flavognost" eine aromatische Borverbindung in den Handel gebracht, die diesen Nachteil nicht aufweisen soll (1o5).

1.5.2.3. Kumarine.

Selbst im neueren Schrifttum trifft man häufig die Meinung, dass die Kapillarwirkung der Rosskastanienextrakte den Kumarinderivaten Aesculin und Aesculetin zuzuschreiben sei (21,1o6,1o7, 1o8,1o9,11o,111,112,113,182). Auch wird nicht immer klar unterschieden zwischen dem Saponin Aescin und dem Kumarinderivat Aesculin, wohl wegen der ähnlich klingenden Namen, oder weil es sich bei beiden Stoffen um Glykoside handelt (86+,1o7,114).

Aesculin ist ein 6-Glukosido-7-oxykumarin und Aesculetin dessen Aglukon :



Aesculin wird zu den Vitamin-P-Substanzen gerechnet (115,116, 117,118,119), welche eine Herabsetzung der Durchlässigkeit aller Zellgrenzflächen bewirken (12o). Dabei soll die Wirkung des Aesculins etwa 5oo mal so gross sein wie die des Citrins (11o).

LECOQ (121,122) bezeichnet Aesculin jedoch als Vitamin C_2, da es nicht wie Rutin eine "alkalogene" Substanz darstellt sondern wie Vitamin C "acidotisch" wirksam ist. Andere Autoren (123) bezeichnen Aesculin als Vitamin P_2.

Die Wirkung des Aesculins wird auch in Zusammenhang gebracht

+Pers. Mitt. des Übersetzers : In der folgenden Auflage soll diese Verwechselung richtiggestellt werden.

mit einer strukturellen Verwandschaft zum Dicumarol (32).

Ausserdem ist Aesculin ein hervorragendes Lichtschutzmittel, da es ultraviolette Strahlung absorbiert (115,124), wobei es sich um den Bereich von 29o mμ - 32o mμ handelt (125), der für die Erythembildung verantwortlich gemacht wird.

Der papierchromatographische Nachweis von Aesculin und Aesculetin ist verschiedentlich beschrieben (126, 127,128,55,61, 129). Er gelingt leicht durch die starke blaue Fluoreszenz dieser Stoffe, die besonders unter der UV-Lampe hervortritt. Auf diese Weise ist bestätigt worden, dass die Samen der Rosskastanie überhaupt keine Kumarinderivate enthalten, worauf schon in den zusammenfassenden Darstellungen von SCHINDLER (7) und GESSNER (82) hingewiesen wurde. Dagegen kommt Aesculin hauptsächlich in der Rinde vor. SCHINDLER (7) gibt einige qualitative Nachweise für Aesculin an, um eine Verfälschung von homöopathischen Aesculus-Zubereitungen mit Rindenextrakten auszuschliessen.

Wenn also Aesculin und Aesculetin nicht in den Aesculus-Samen enthalten sind, können diese Stoffe auch nicht an der Wirkung der Samenextrakte beteiligt sein, worauf bereits hingewiesen wurde (13o).

Zwar hat WANKMÜLLER (126) auch in einigen Handelspräparaten Aesculin nachgewiesen, jedoch kann dieses nur aus Rindenextrakten stammen oder den Samenauszügen als Substanz zugesetzt sein.

CORCILIUS (61) und REPPEL (129) haben papierchromatographisch das Vorkommen von Kumarinderivaten in Aesculus Hippocastanum untersucht und festgestellt, dass Aesculin und Aesculetin hauptsächlich in der Rinde jüngerer Zweige vorkommen. In den Laubblättern wurde in geringerer Menge nur Aesculin gefunden, hauptsächlich lokalisiert in den Blattspreiten. Da Venoplant$^{(R)}$-Injektionslösung als Blattextrakt deklariert ist, dürfte sich hier die eventuelle Anwesenheit von Aesculin erklären.

1.5.2.4. Aminopurine.

FIEDLER (131) berichtete erstmals über das Vorkommen von Purinkörpern, die später von FIEDLER und HILDEBRAND (132) genauer beschrieben wurden. Dabei wurden Adenin, Adenosin, Guanin und

Harnsäure genannt, die papierchromatographisch in Samen, Blüten und Blättern nachgewiesen wurden. Die einzelnen Pflanzenteile unterschieden sich hinsichtlich des Vorkommens dieser Stoffe lediglich durch die Konzentration und das Mischungsverhältnis. Aus den Samen wurden die genannten Purine papierchromatographisch als Strichchromatogramm präparativ isoliert. In 3o kg geschälter Samen wurden auf diese Weise 21 mg Adenin, 1o mg Adenosin, 23 mg Guanin und 24 mg Harnsäure in reiner kristallisierter Form gefunden.

Auf Grund der starken pharmakodynamischen Wirkung der Aminopurine, insbesondere am graviden Uterus, fordern FIEDLER und HILDEBRAND (132) die Standardisierung von Injektionslösungen in Hinblick auf die Aminopurine.

Die Wirkung der Aminopurine in Aesculus-Auszügen ist jedoch nicht allgemein anerkannt. So lehnt KÜHNEL (133) auf Grund seiner Untersuchungen die Forderung von FIEDLER und HILDEBRAND auf Standardisierung ab, da für die in den Auszügen vorhandenen Mengen von Aminopurinen bisher keine therapeutische, geschweige denn eine toxikologische Bedeutung nachgewiesen sei. Nach LAMPRECHT (134) enthalten die in Deutschland handelsüblichen i.v. zu applizierenden Aesculus-Auszüge in 1 ml bis zu 6o µg Adenosin und ausserdem bis zu 2oo µg Adenosinphosphorsäuren. Das seien Mengen, die nach KÜHNEL für die tierexperimentell beobachteten Wirkungen, wenn überhaupt, nur in sehr geringem Masse verantwortlich zu machen seien.

1.6. Wirkung und Anwendung.

Obwohl Aesculus-Präparate heute einen gesicherten Platz im Arzneischatz besitzen, sind in den bekannten Lehrbüchern der Pharmakologie kaum Angaben zu finden.

1.6.1. Wirkung von Aesculus-Saponin.

Pharmakologische Prüfungen des reinen, kristallisierten Aescins sind bisher nicht bekannt geworden. Auch die nach älteren Verfahren hergestellten weniger reinen Produkte sind pharmakologisch wenig untersucht. Hier bleibt also noch eine Lücke zu schliessen, bis endgültig entschieden werden kann, ob

überhaupt oder in welcher Weise das Aescin an der Wirkung der Aesculus-Auszüge beteiligt ist.

HINDEMITH (135) prüfte ein Saponin von mittlerer Reinheit hinsichtlich der Giftwirkung bei Ratten. Es wurde, auch bei chronischer Darreichung, nur eine geringe Giftigkeit festgestellt. Ob dieses auf geringer Resorption oder Zersetzung beruht, wird nicht entschieden.

AUSTER (136) prüfte die Wirkung von Aesculus-Extrakten auf die Wasserpenetration der Froschhaut. Als Vergleichssubstanz diente "Rosskastaniensaponin MERCK"+. In beiden Fällen wurde eine mehr oder minder ausgedehnte Ödembildung am Frosch festgestellt. Extrakte, aus denen das Saponin teilweise entfernt war, ergaben eine entsprechende Wirkungsminderung, wodurch die Ödembildung eindeutig auf den Saponingehalt zurückgeführt wurde.

Über ähnliche Erscheinungen bei Anwendung von Saponinen im allgemeinen berichtet HESSE (137). Mäuse beginnen nach der Gabe von Saponinen zu schwitzen und sind stunden- oder tagelang in Schweiss gebadet. Gleichzeitig tritt eine Konjunktivitis ein sowie eine vermehrte Harnabsonderung. HESSE bringt in seinem Lehrbuch auch eine Tabelle über Saponinwirkungen, die auf KOFLER zurückgeht.

BERGMANN und FREY (138) schreiben den Saponinen das Bewirken einer symptomatischen Hämoglobinurie zu.

Nach HAUSCHILD (139) ist eine Resorptivwirkung der Saponine nicht nachweisbar. Viele Saponine sollen schon im Magen gespalten werden.

Neuere Untersuchungen stammen von FROMM (140), durchgeführt mit einem Präparat, dessen Saponin hinsichtlich der Deklaration dem Verfahren von BOEDECKER (64) entspricht. FROMM konnte keine Wirkung auf die Kapillaren der Versuchstiere feststellen. Das Gleiche gilt für die Wirkung auf den Blutstatus. Eine intestinale Resorption wurde bejaht, da bei Überdosierung die Tiere kollabierten und eingingen.

SCHWEITZER (141) berichtete über drei Vergiftungsfälle bei Kindern nach dem Genuss von Aesculus-Samen, davon ein Fall mit

---

+Pers. Mitt. der Fa. E. MERCK : Wird heute nicht mehr hergestellt.

tödlichem Ausgang. Auf Grund der Obduktionsergebnisse wurde dem Saponin die Giftwirkung zugeschrieben, woraus geschlossen wurde, dass die Giftwirkung doch grösser sei als durch die Versuche von HINDEMITH (135) bislang angenommen wurde.

Die hämolytische Wirkung des Saponins ist schon im Zusammenhang mit den Bestimmungsmethoden (S.23) erwähnt worden. Über den Mechanismus der Saponinhämolyse sind die Meinungen geteilt. Zum Teil wird das Cholesterinbindungsvermögen als das primäre und entscheidende Faktum angesehen (142,143), zum Teil wird diese Meinung abgelehnt (144).

1.6.2. Wirkung der Flavonoide.

Die Flavonoide allgemein, und somit auch die in Aesculus Hippocastanum gefundenen, werden zu den Vitamin-P-Substanzen gerechnet (12o,88,115,145,137,146,91), was auf SZENT-GYÖRGYI und das von ihm gefundene "Citrin" (147), ein Gemisch von Hesperetin- und Eriodictinglykosiden, zurückgeht (148). Neuerdings wird den Flavonoiden eine Vitamineigenschaft abgesprochen, und es wird die Bezeichnung "Bioflavonoide" vorgeschlagen (148,87). Der am meisten untersuchte Stoff dieser Gruppe ist das Rutin, das auch Aufnahme in den 3. Nachtrag (1959) zum DAB VI. gefunden hat.

Einen Überblick über die Wirkungen der Flavonoide geben KÜSSNER (91), JENEY und URI (145), ISAAC (146) und BÖHM (87). Hierin werden u.a. die starke UV-Absorption, die Hemmung der Adrenalinoxydation und die Hemmung der Hyaluronidaseaktivität genannt.

Klinische Untersuchungen ergaben folgende Wirkungen, aus denen sich die entsprechenden Indikationen ergeben : Strahlenschutzwirkung, Herabsetzung der Gefässpermeabilität und Steigerung der Kapillarresistenz, Anregung der Diurese, milde Herz- und Kreislaufwirkung und Beeinflussung des Kalkstoffwechsels (145,146,87,149,15o).

Eine besonders grosse Kapillarwirkung besitzt nach LAVOLLAY (163) das Epikatechin, das jedoch sehr unbeständig ist. KÜHNAU (88) nimmt an, dass eine entsprechende Umwandlung der Flavonoide in Epikatechin in der lebenden Zelle erfolgt.

1.6.3. Wirkung der Aesculus-Auszüge.

Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Aesculus-Auszügen, wobei es sich meist um Samenauszüge handelt, sind fast ausschliesslich neueren Datums. Dabei stehen zunächst zwei Wirkungskomponenten im Vordergrund, nämlich die Kreislaufwirkung vorwiegend durch Venentonisierung und die Beeinflussung der Kapillarpermeabilität und Fragilität (151).

Die Kreislaufwirkung ist experimentell nachgewiesen (11o,111, 152,153,154), ebenso die Erhöhung der Kapillarresistenz (112, 155,156,11o,157,158) und die Herabsetzung der Kapillarpermeabilität (155,156,152,113,159).

GIGGLBERGER und KLEIBEL (112) erreichten nach i.v. Gaben von Aesculus-Auszügen eine Steigerung der Kapillarresistenz um durchschnittlich 127 %, nach hoher oraler Dosierung eine Steigerung von durchschnittlich 147 %.

KÜCHMEISTER (155) fand jedoch nach höherer i.v. Dosierung nur eine Steigerung von 48 %.

Die Methodik der Untersuchungen war verschieden. Es wurde mit der Saugglocke gearbeitet, nach der Stauungsmethode und nach der Kantharidenblasenmethode.

Weitere experimentelle Arbeiten hinsichtlich Diurese, Ödemausschwemmung, Beeinflussung der Blutgerinnungsfaktoren, Heparinaemie, Eingriff in das Hyaluronsäure-Hyaluronidasesystem, Senkung des Blutcholesterinspiegels, Verhinderung des anaphylaktischen Schocks sowie zentrale Wirkung u.a. werden mit entsprechenden Literaturangaben von MATHIES (151) zusammengestellt.

1.6.4. Anwendung von Aesculus-Auszügen.

Hinsichtlich der Unterlagen über die therapeutische Anwendung von Aesculus-Zubereitungen muss darauf geachtet werden, welche Pflanzenteile jeweils verarbeitet worden sind. Ältere Veröffentlichungen nehmen hierauf keine Rücksicht. Neuere Arbeiten beziehen sich meist auf die Anwendung von Zubereitungen der Samen.

Einen Überblick über die Anwendung in der Volksheilkunde gibt MADAUS (1). Ausserdem wird hier auf die Verwendung durch

HAHNEMANN, den Begründer der Homöopathie, und durch HUFELAND eingegangen.

Allgemeinen Eingang in die Therapie fanden Aesculus-Präparate jedoch erst in jüngerer Zeit (16o), basierend auf den Arbeiten von RATSCHOW und Mitarbeitern (161,162,111). Inzwischen ist die Zahl der klinischen Veröffentlichungen laufend angestiegen.

Der Indikationsbereich der Aesculus-Zubereitungen deckt sich teilweise mit dem der Flavonoide (55).

Einen Überblick über die neuere Literatur gibt MATHIES (151). Hier werden als Indikationen u.a. genannt : Varizen, Hämorrhoiden, Thrombophlebitis, Thromboseprophylaxe, postthrombotische Zustände, Ulcus cruris, arterielle Durchblutungsstörungen, Migräne, Ménièrescher Symptomenkomplex, dysmenorrhoische Beschwerden, hämorrhagische Diathesen, zirrhotische Stauungsleber, Prostatahyperthrophie, lokale Permeabilitäts- und Durchblutungsstörungen, Perniosis, Brachialgia paraesthetica nocturna sowie bestimmte rheumatische Erkrankungen.

2. Experimenteller Teil.

2.1. Saponin.

2.1.1. Gewinnung der Reinsubstanzen.

2.1.1.1. Aufbereitung der Samen.

Ein Teil der verarbeiteten Samen, im folgenden als Typ A bezeichnet, wurde im Herbst 1956 in einer Kastanienallee bei Schmalensee im Kreise Plön/Holstein selbst gesammelt. Zum Trocknen wurden die Samen in dünner Schicht auf Holzroste ausgebreitet, die in geheizten Räumen aufgestellt waren. Um Schimmelbefall zu vermeiden, wurde häufig umgewälzt. Ein Schälen vor dem Trocknen hat sich nicht als zweckmässig erwiesen, da dann der Schimmelbefall noch leichter auftrat.

Bei den lufttrockenen Samen wurde manuell die Samenschale entfernt. Dann wurden die Samen mit einer Drogenmühle zerkleinert und solange im Starmix gepulvert, bis beim Reiben durch Sieb V kein Rückstand verblieb. Diese feine Pulverisierung erschien notwendig, um eine möglichst weitgehende Extraktion zu erzielen (164,165). Auf nicht zu starkes Erwärmen beim Zerkleinern und Pulvern wurde geachtet. Dieses Samenpulver (Typ A) hatte ein gelblich-weisses Aussehen.

Ausserdem wurden noch Samenpulver aus dem Handel bezogen, im folgenden als Typ B und Typ C bezeichnet, die wegen der mitgemahlenen Samenschale gelbbraun gefärbt waren.

Typ B : Korngrösse Sieb V, Herkunft laut Angaben der Lieferfirma Süddeutschland, Erntejahr 1956.

Typ C : Herkunft laut Angaben der Lieferfirma Belgien, Erntejahr 1956. Hier wurde mit Sieb V abgesiebt. Der feinere Anteil soll als C V, der gröbere als C IV bezeichnet werden.

Die einzelnen Typen wurden stets unvermischt weiterverarbeitet, wobei zunächst unter wiederholtem Umwälzen in dünner Schicht im Trockenschrank bei einer 50° nicht übersteigenden Temperatur nachgetrocknet wurde.

Zum anschliessenden Entfetten wurde jeweils 1 kg Samenpulver

unter Durchkneten mit soviel Petroleumbenzin (DAB VI.) versetzt, dass ein giessbarer Brei vorlag. Dieser wurde auf eine grosse mit gehärtetem Filtrierpapier ausgelegte Nutsche gegeben. Es wurde noch soviel Benzin nachgegossen, bis sich über dem Samenpulver ein mehrere cm hoher Flüssigkeitsspiegel befand und das Lösungsmittel aus der Nutsche abzutropfen begann. Ein Einschluss von Luftblasen wurde vermieden. Am nächsten Tag wurde zur Trockne abgesaugt und anschliessend wieder Benzin aufgegossen, einen Tag stehen gelassen und wieder abgesaugt.

Dieser Prozess wurde solange wiederholt, bis das abtropfende Benzin, auf weisses Papier getropft, nach dem Verdunsten keinen Rückstand mehr hinterliess. Hierzu war ein drei- bis viermaliges Aufgiessen und Absaugen erforderlich. Die gelbliche Benzinlösung wurde verworfen.

Eine Perkolation des feinen Pulvers war nicht möglich.

Nach dem Entfetten wurde das Samenpulver getrocknet. Es bildete sich ein granulatähnliches Trockengut, das durch Sieb V bzw. IV geschlagen wurde. Hierbei staubte das Pulver stark, verursachte Niessreiz, Tränen der Augen und Kratzen im Rachen.

Ein vollstängiges Entfetten der Samenpulver war erforderlich, da Versuche zur Gewinnung der Reinsubstanzen aus nicht entfettetem Samenmehl unbefriedigend verliefen.

2.1.1.2. Extraktionsverfahren.

2.1.1.2.1. DAB-Methoden.

Es wurde zunächst versucht, einen Fluidextrakt im Sinne des DAB VI. herzustellen. Eine Perkolation des feinen Pulvers war jedoch nicht möglich.

Auch die andere DAB-Extraktionsmethode, die Mazeration, wurde versuchsweise durchgeführt. Es gelang zwar, aus einem Mazerat Aescin zu gewinnen, für die Verarbeitung von etwa 4o kg entfetteten Samenmehls erschien diese Extraktionsmethode jedoch zu langwierig und unrationell.

2.1.1.2.2. Soxhlet-Extraktion.

1oo g entfettetes Samenpulver Typ A wurde in eine Extrakti-

onshülse gefüllt und mit 5oo ml Methanol (Erg.B.6.) in einer Soxhlet-Apparatur solange extrahiert, bis die ablaufende Flüssigkeit keinen gelben Farbton mehr zeigte. Der Prozess war sehr langwierig und nahm etwa 4 Tage in Anspruch. Es gelang zwar, aus dem so bereiteten Auszug Aescin und Aescinol zu gewinnen, wegen der Langwierigkeit wurde diese Extraktionsmethode jedoch wieder aufgegeben.

Ausserdem wurde dieser Extrakt, als A/V/1oo/S bezeichnet, später der Flavonoidbestimmung unterworfen.

2.1.1.2.3. Ausrühren.

Gemäss einer Anregung MERKEL's (54) wurde das Samenpulver in einem Rührwerk mit dem Lösungsmittel ausgerührt.

Das verwendete Rührwerk bestand aus einem hohen zylinderförmigen Stahlblechkessel, über dessen Öffnung der Elektromotor angebracht war, an dessen langer Welle kurz über dem Kesselboden zwei schiffsschraubenähnliche Rührmuttern sassen. Am Boden des Kessels befand sich ein Ablasshahn.

Jeweils 1 kg entfettetes Samenmehl wurde in diesem Rührwerk mit jeweils 5 l Methanol (8o Vol.%) etwa 1o Stunden lang ausgerührt. Die Mischung wurde auf einer Nutsche bis zur Trockne abgesaugt und dann mit soviel Methanol (8o Vol.%) nachgewaschen, dass der Auszug 5 l betrug.

Es wurden auf diese Weise etwa 2o kg Samenmehl extrahiert.

Die gewonnenen Extrakte besassen je nach Art des extrahierten Samenmehls eine unterschiedliche Färbung. Bei Verwendung von Typ A waren die Extrakte hellgelb gefärbt, bei Verwendung von Typ B und Typ C infolge der Beimengung von Samenschale gelbbraun. Die Auszüge werden im folgenden mit A/V/8o, B/V/8o, C/V/8o und C/IV/8o bezeichnet, wobei die römische Ziffer die Siebweite und die Zahl 8o die Methanolkonzentration angibt.

Diese Auszüge wurden später der Aescingewinnung und der Bestimmung auf Flavonoide unterworfen.

Einige Male wurde das nach dem Abnutschen und Nachwaschen noch feuchte Samenmehl einer zweiten Extraktion durch 1o-stündiges Ausrühren unterzogen. Dieser zweite Auszug war stets heller gefärbt als der jeweilige erste. Eine Reaktion mit Fla-

vognost auf Flavonoide verlief stets positiv. Papierchromatographisch konnte jedesmal Aesculus-Saponin nachgewiesen werden. Jedoch gelang es nie, aus einem zweiten Auszug nach dem noch zu besprechenden Verfahren Aescin zu gewinnen. Der Gehalt an Saponin schien zu gering zu sein, um eine Ausfällung im Laufe der Gewinnung zu ermöglichen.

Das extrahierte Samenmehl wurde portionsweise getrocknet und gewogen. Das durchschnittliche Gewicht betrug jeweils 73o g. Es waren also durch die Extraktion durchschnittlich 27o g herausgelöst worden, entsprechend 27 %.

2.1.1.2.4. Kochen mit aufgesetztem Rückflusskühler.

Jeweils 1 kg entfettetes Samenmehl A/V und B/V wurde mit 5 l Methanol (1oo %) durchgerührt und im Siko-Topf bei festgeschraubtem Deckel und aufgesetztem Rückflusskühler eine Stunde zum Sieden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde abgesaugt und das Volumen des Auszuges durch Nachwaschen mit Methanol auf 5 l gebracht. Das noch feuchte Samenmehl wurde ein zweites Mal in der gleichen Weise extrahiert.

Die so bereiteten ersten Auszüge werden im folgenden mit A/V/1oo/1 und B/V/1oo/1 bezeichnet, die dazugehörigen zweiten Auszüge mit A/V/1oo/2 und B/V/1oo/2. Die Färbung dieser Auszüge war die gleiche wie die der ausgerührten.

Die weitere Verwendung diente der Gewinnung von Aescinol-Kalium. Eine Probe A/V/1oo/1 wurde zur Flavonoidbestimmung herangezogen.

2.1.1.3. Gewinnung von Aescin.

Die Gewinnung erfolgte nach einem Verfahren, das im Prinzip auf MERKEL (54) zurückgeht, jedoch hinsichtlich der Durchführung einiger Änderungen bedurfte, die den eigenen apparativen Möglichkeiten Rechnung zu tragen hatten.

Jeweilt 5 l eines ausgerührten Extraktes wurden filtriert und in einen 1o l fassenden Rundkolben mit weitem langem Hals gegeben. In diesem Auszug wurde dann so viel Oxalsäure gelöst, dass der pH-Wert der Lösung 1,5-2,o betrug, geprüft mit Universalindikatorpapier MERCK. Es waren etwa 12 g Oxalsäure erforderlich.

Der Kolben war mit einem Gummistopfen verschlossen, in dessen Bohrung ein Schliffeinsatz sass, der einen Destillieraufsatz mit einem 1 m langen Kühler trug. Als Vorlage diente eine 5 l fassende graduierte Saugflasche. In dem Tubus des Siedeaufsatzes war ein 1 l fassender Scheidetrichter befestigt, dessen Ablaufrohr weit in den Hals des Rundkolbens hinabragte. An einem festgeklemmten Faden hing ein Thermometer, das gerade in den Extrakt hineinragte.

Der Scheidetrichter wurde mit warmem Wasser gefüllt und der Extrakt auf einem Gaskocher zum Sieden erhitzt. Das übergehende Destillat wurde ständig durch die entsprechende Raummenge Wasser ersetzt, die aus dem Scheidetrichter zufloss. Der zunächst methanolig-wässrige Auszug wurde mehr und mehr in einen wässrigen Auszug überführt, wobei sich das Volumen des Auszuges nicht änderte. Die Siedetemperatur stieg dabei langsam an, und der siedende Auszug begann mehr und mehr zu schäumen. Um ein Überschäumen zu verhindern, wurde die Gasflamme immer mehr gedrosselt.

Bei etwa 88° zeigte der bislang blanke Auszug eine leichte Trübung, die sich mit der Zeit verstärkte. Bei etwa 9o° war bereits eine helle Ausfällung zu erkennen, deren einzelne Kristalle infolge des Kochvorganges den ganzen Auszug erfüllten. Es wurde in der angegebenen Weise noch weiter bis zur Siedetemperatur von 92° erhitzt, wobei der Scheidetrichter laufend nachgefüllt wurde. Dann wurde die Destillation abgebrochen. Es waren etwa 4 l Destillat übergegangen. Der Vorgang hatte etwa 6 Stunden in Anspruch genommen.

Nach 1/2 Stunde hatte sich auf dem Boden des Kolbens ein heller Niederschlag abgesetzt. Die darüberstehende Flüssigkeit war gelbbraun (Samentyp A) bzw. dunkelrotbraun (Typen B und C) gefärbt. Der Niederschlag wurde bei Verwendung einer grossen Nutsche heiss abgesaugt, ein Vorgang, der relativ viel Zeit (etwa 4 Stunden) erforderte. Es wurde eine doppelte Lage dikken gehärteten Filtrierpapiers verwendet. Andere Papiere und einfache Lagen ergaben kein blankes Filtrat.

Der abgesaugte Niederschlag (Roh-Aescin) wurde im Trockenschrank bei 11o° getrocknet und anschliessend im Mörser zerrieben. Es entstand ein gelblich-weisses Pulver, das bei Verwen-

dung der Samentypen B und C mehr gelblich gefärbt war.

Der beschriebene Gewinnungsgang wurde 2o mal durchgeführt. Die durchschnittlichen Ausbeuten bei den verschiedenen Samentypen und Korngrössen betrugen :

A/V	B/V	C/V	C/IV
0,86 %	1,6 %	0,38 %	0,2 %

bezogen auf entfettetes Samenmehl.

Die Zahlen differieren aus nicht ersichtlichen Gründen sehr. Seltsamerweise ergab eine ungeschälte Droge die besten Ausbeuten. Dass eine weniger fein gemahlene Droge die geringsten Ausbeuten lieferte, ist einzusehen.

Nach jedem Gewinnungsgang wurde zunächst der Schmelzpunkt überprüft, der je nach Reinheit zwischen 212° und 218° lag. Die einzelnen Chargen wurden vereinigt (22o g), in 2,2 kg Methanol gelöst, filtriert, das Filtrat mit 1o g Aktivkohle versetzt und kurz zum Sieden erhitzt. Nach dem Absaugen wurde das heisse, blanke Filtrat mit 3 l heissem Wasser versetzt, wobei das Aescin auszukristallisieren begann. Nach völligem Erkalten und 2-tägigem Stehen im Eisschrank wurde abgesaugt und mit wenig kaltem Methanol nachgewaschen. Dieser Reinigungsprozess wurde noch zweimal wiederholt, dann das Aescin bei 11o° getrocknet. Die Ausbeute an Rein-Aescin betrug 195 g = etwa 1 %, bezogen auf entfettetes Samenmehl.

Eigenschaften : Das getrocknete Aescin wurde im Mörser zerrieben. Dabei trat heftiger Husten- und Niessreiz auf, begleitet von Tränenfluss, Kratzen im Rachen und Hypersekretion der Nasenschleimhaut. Die Erscheinungen klangen erst nach einigen Stunden ab. Der Geschmack des Aescins ist sehr bitter und widerlich kratzend.

Der Schmelzpunkt des weissen Pulvers beträgt 222° (LEITZ-Heiztischmikroskop). Es ist leicht löslich in Alkoholen, sehr schwer löslich in Wasser (etwa 7 mg% (166)), unlöslich in Kohlenwasserstoffen, Äther und Chloroform, löslich in Eisessig und Pyridin. Mit Alkalien entstehen wasserlösliche, salzartige Verbindungen (58,166).

Verarbeitung der Aescin-Mutterlauge : Das nach Absaugen des Roh-Aescins (S.42) verbleibende Filtrat enthielt noch weitere

Mengen Saponin. Dieses wurde auf Grund papierchromatographischer Untersuchungen festgestellt, wobei jedoch kein Aescinol und kein Aescinolgenin gefunden wurde.

Das Filtrat wurde etwa 1 Stunde zur Entfernung des restlichen Methanols gekocht, dann noch heiss mit 1o %iger wässriger Natronlauge bis auf einen pH-Wert von 8-9 alkalisiert, wobei die Mutterlauge eine schwarzbraune Farbe annahm. Anschliessend wurde mit verdünnter Schwefelsäure wieder angesäuert auf pH 1, wobei wieder eine Aufhellung der Farbe erfolgte und ein voluminöser Niederschlag ausfiel, der während des Abkühlens immer mehr zunahm. Nach völligem Erkalten wurde abgesaugt, was etwa 12-15 Stunden in Anspruch nahm. Der braune Niederschlag hatte thixotrope Eigenschaften und hielt stets einen Rest Wasser zurück. Er wurde noch feucht in 3 l Wasser eingetragen, das dann in einem Kolben bei aufgesetztem Rückflusskühler zum Sieden erhitzt wurde. Durch den Kühler wurde solange Isopropanol in die siedende Mischung gegeben, bis der Niederschlag in Lösung gegangen war, wozu etwa 1oo g Isopropanol erforderlich waren. Nach Zugabe von 1o g Aktivkohle wurde dann 1/2 Stunde unter Rückflusskühlung gekocht, dann heiss abgesaugt und der nach dem anschliessenden Erkalten ausgefallene Niederschlag abgesaugt und erneut mehrmals diesem Reinigungsprozess unterzogen. Es gelang im Gegensatz zu MERKEL (67) jedoch nicht, den Niederschlag nennenswert aufzuhellen, geschweige denn auf diese Weise reines Aescin zu gewinnen.

Später wurde bei Aufarbeitung der Mutterlaugen der abgesaugte braune Niederschlag jedesmal getrocknet und im Mörser zerrieben. Es entstand ein braunes nicht hygroskopisches Pulver, das im Geschmack an Aescin erinnerte. Die einzelnen Chargen wurden vereinigt und später auf Aescinol-Kalium verarbeitet, wobei keine Schwierigkeiten auftraten.

Eine spätere papierchromatographische Untersuchung dieses braunen Pulvers ergab, dass es neben Begleitstoffen als Saponinfraktion zur Hauptsache natives Saponin und nur wenig Aescin enthielt. Unter den beschriebenen Bedingungen der Aescin-Gewinnung und der Behandlung der Mutterlaugen wird also nur ein Teil des nativen Saponins in Aescin umgewandelt.

2.1.1.4. Gewinnung von Aescinol-Kalium.

Aescinol-Kalium, das Kaliumsalz der Aescinol-Säure, die von RÖMISCH Aescinol genannt wurde, ist gleichfalls nach einem Verfahren von MERKEL (58) gewonnen worden, jedoch war MERKEL noch der Meinung, ein Prosapogenin gewonnen zu haben (S.18).

Die jeweils zusammengehörigen Auszüge A/V/1oo/1 und A/V/1oo/2 bzw. B/V/1oo/1 und B/V/1oo/2 (S.41) wurden vereinigt (1o l) und auf etwa 1,5 l eingedampft. Dieses trübe, braune Konzentrat wurde unter Umrühren in Anteilen mit 0,25 l einer 1o %igen methanolischen Kalilauge versetzt. Dabei fiel ein reichlicher, gelber, voluminöser Niederschlag aus, der wiederholt durchgerührt und nach 24-stündigem Stehen scharf abgesaugt wurde. Der stark hygroskopische, an der Luft zu einer braunen Masse zerfliessende Niederschlag wurde sofort in 1 l siedendem Wasser gelöst, wobei der entweichende Dampf einen typischen süsslich-esterartigen Geruch aufwiess. Der nach völligem Erkalten ausgefallene Niederschlag wurde abgesaugt und mit kaltem Wasser nachgewaschen. Die einzelnen Chargen des nach dem Trocknen gelblich-weissen Niederschlages (Roh-Aescinol-Kalium) wurden der Schmelzpunktbestimmung unterzogen (265^{o} - $27o^{o}$) und dann vereinigt.

Analog wurde das aus der Aescin-Mutterlauge gewonnene braune Pulver (S.44) aufgearbeitet. Eine 1o %ige methanolische Lösung wurde unter Umrühren solange mit 1o %iger methanolischer Kalilauge in Anteilen versetzt, bis kein Niederschlag mehr ausfiel. Dieser wurde wie oben beschrieben weiterverarbeitet. Jedoch war der auf diese Weise gewonnene Niederschlag nach dem Umfällen aus der wässrigen Lösung dunkler gefärbt und wurde deshalb einmal unter Rückflusskühlung mit Methanol ausgekocht und nach dem Erkalten wieder abgesaugt. Beim Vergleich hinsichtlich Aussehen, Schmelzpunkt und R_F-Wert mit dem oben beschriebenen Roh-Aescinol-Kalium wurden keine Unterschiede festgestellt, worauf beide Produkte vereinigt wurden.

Zur Reinigung wurden die vereinigten Niederschläge mit der 5-fachen Menge Methanol unter Rückflusskühlung gekocht, nach dem Erkalten abgesaugt, getrocknet und dann in der 8-fachen Menge Methanol 6o % (Vol./Vol.) heiss gelöst. Die Lösung wurde mit 1o g Aktivkohle versetzt, zum Sieden erhitzt und dann heiss abgesaugt. Der nach dem Erkalten der Lösung ausgefallene Nieder-

schlag von Aescinol-Kalium wurde abgesaugt und noch zweimal dem Reinigungsprozess mit Kohle unterzogen, dann bei 11o° getrocknet und anschliessend im Mörser zerrieben.

Eigenschaften : Es lag ein weisses Pulver vor, löslich zu etwa 2 % in siedendem Wasser, besser in heissen verdünnten Alkoholen, unlöslich in Äther, Chloroform, Azeton und Kohlenwasserstoffen. Der Schmelzpunkt (Zersetzung) lag bei 28o° (LEITZ-Heiztischmikroskop). Der Geschmack war schwach bitter, nicht kratzend.

2.1.1.5. Gewinnung von Aescinol (=Aescinol-Säure).

Eine Menge Aescinol-Kalium wurde in der 7o-fachen Menge siedendem Wasser gelöst und die Lösung so lange tropfenweise mit verdünnter Schwefelsäure versetzt, bis kein Niederschlag (Aescinol) mehr ausfiel. Nach völligem Erkalten wurde das Aescinol abgesaugt und so lange mit Wasser nachgewaschen, bis das ablaufende Waschwasser neutrale Reaktion zeigte. Das getrocknete Aescinol wurde in der 1o-fachen Menge Methanol heiss gelöst und die Lösung mit dem doppelten Volumen heissem Wasser versetzt, wobei das Aescinol wieder ausfiel. Nach völligem Erkalten wurde abgesaugt, der Niederschlag getrocknet und das Umfällen noch einmal wiederholt. Der dann bei 11o° getrocknete Niederschlag von Aescinol wurde im Mörser zerrieben.

Eigenschaften : Es lag ein weisses Pulver vor von schwach bitterem, nicht kratzendem Geschmack. Die Löslichkeitsverhältnisse entsprachen etwa denen des Aescins. Der Schmelzpunkt betrug 234° (LEITZ-Heiztischmikroskop).

2.1.1.6. Gewinnung des Genins (=Aescinolgenin).

Als Bezugssubstanz für papierchromatographische und hämolytische Untersuchungen sowie zur Prüfung der Frage des Angriffspunktes der Farbreaktion (S.67) wurde etwas Genin benötigt.

In der Literatur (4o,41) wird von einer sehr schweren Hydrolysierbarkeit des Aescins gesprochen. Deshalb wurde für die Hydrolyse hinsichtlich des Säurezusatzes und der Einwirkungsdauer die Vorschrift von RUZICKA (49) übernommen, welche gegenüber anderen Mitteilungen die schärfsten Bedingungen angibt.

1o g Aescin wurden in 6o g Methanol gelöst, die Lösung mit 4o g verdünnter Salzsäure versetzt und anschliessend unter Rück-

flusskühlung 74 Stunden auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Die zunächst farblose Lösung nahm dabei allmählich eine braune Färbung an. Schon nach wenigen Stunden machte sich der von der Aescinol-Kalium-Gewinnung (S.45) bekannte typische, süssliche Estergeruch bemerkbar, ein Beweis, dass auch unter der Einwirkung von Säure Aescin in Aescinol übergeht, was auch schon RÖMISCH (5o) beobachtet hatte.

Um jegliche spätere Verunreinigung durch Tiglinsäure auszuschliessen, wurde der vorstehend beschriebene Ansatz nicht weiter verarbeitet, sondern die Hydrolyse unter gleichen Bedingungen mit Aescinol wiederholt.

Nach dem Reinigen mit Aktivkohle und mehrfachem Umkristallisieren wurde das "Aescinolgenin" in Form nadelförmiger Kristalle erhalten vom Schmelzpunkt 31o° (LEITZ-Heiztischmikroskop). Eine Reinigung durch Sublimation des Tetraazetates im Hochvakuum (51) war aus äusseren Gründen nicht möglich.

Die Bezeichnung "Aescigenin" für das Hydrolyseprodukt, die sich meist in der Literatur findet, scheint jedoch nicht treffend zu sein, worauf bereits hingewiesen wurde (S.17). Deshalb ist hier die exaktere Bezeichnung "Aescinolgenin" gewählt worden.

2.1.1.7. Infrarot-Spektrographie.

Um zu untersuchen, ob die Tiglinsäure Bestandteil des Aescinmoleküls sein kann, wurden Infrarotspektren von Tiglinsäure und Aescin aufgenommen+. Das Spektrum der Tiglinsäure enthält bei 1o,35 μ eine charakteristische trans-Doppelbindungsschwingung, die im Spektrum des Aescins fehlt. Die Tiglinsäure kann also als Bestandteil des Aescinmoleküls ausgeschlossen werden.

Im Spektrum des Aescins fallen zunächst die Schwingungen bei 3 μ, entsprechend den OH-Gruppen, und bei 3,5 μ entsprechend den CH_3- und CH_2-Gruppen, auf. Im Bereich der Doppelbindungsvalenzschwingungen folgen die Carbonyl-Bande bei 5,85 μ und die C=C-Bande bei 6,15 μ, die im vorliegenden Falle die Doppelbindung im Ringsystem anzeigt. Es folgt der Bereich der

+Herrn Dr.Maennchen in Fa.E.Leitz/Wetzlar sei für die Aufnahme der IR-Spektren und die Unterstützung bei der Deutung herzlich gedankt.

Deformationsschwingungen mit ausgeprägten Banden bei 7,3 μ für die CH_3-Gruppen, bei 8,o μ für die Ätherbrücke und bei 8,65 μ für die CH_2OH-Gruppen. Zwischen 9 μ und 1o μ folgen die breiten für Glykoside typischen Banden.

Die Spektren des Aescins und Aescinols sind als identisch anzusehen, das Fehlen der Estergruppen macht sich nicht bemerkbar. Dagegen unterscheidet sich das Spektrum des Aescinol-Kaliums von diesen Spektren dadurch, dass die Carbonylschwingung bei 5,85 μ hier nur durch eine Schulter angedeutet ist.

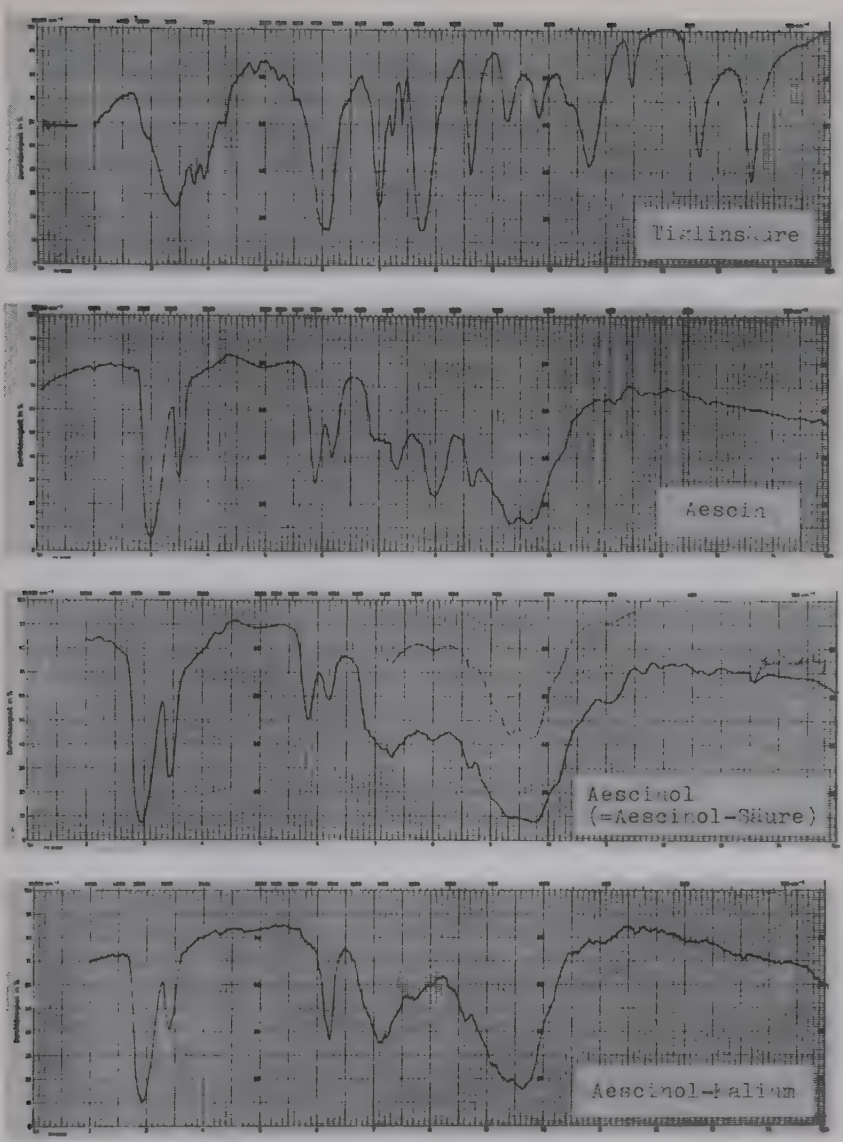
Die beschriebenen IR-Spektren sind auf S.49 abgebildet.

2.1.2. Hämolyse.

Der hämolytische Index des gewonnenen Aescins wurde nach der Methode der Schweizer Pharmacopoe bestimmt (13), die auch für das neue Deutsche Homöopathische Arzneibuch vorgeschlagen wurde (S.9). Der gefundene Wert von 285.ooo besagt, dass das Aescin eine ausserordentlich starke hämolytische Wirksamkeit besitzt. Der Wert stimmt grössenordnungsmässig mit Angaben der Literatur überein. FUCHS (59) fand 258.ooo, RÖMISCH (5o) gibt 28o.ooo an, MERKEL (54) 288.ooo.

Der hämolytische Index für das aus dem Cholesterid hergestellte native Aesculus-Saponin wurde von RÖMISCH (59) mit 14o.ooo festgestellt, ist also etwa halb so gross wie der des Aescins. Für diese Erscheinung liegt bisher keine Erklärung vor. Es kann aber angenommen werden, dass die "hämolytisch wirkende Gruppe" des Aescins (S.18) an der Bindung im nativen Saponinkomplex beteiligt und dabei zum Teil blockiert ist. Da nicht festzustellen ist, ein wie grosser Anteil des Saponins als Aescin vorliegt, wird die Bestimmung des hämolytischen Index bei Aesculus-Zubereitungen problematisch.

Sinnvoll erscheint eine Bestimmung des HI nur, wenn vorher durch papierchromatographische Untersuchungen festgestellt ist, dass in der zu untersuchenden Zubereitung kein Gemisch von Aescin und nativem Saponin vorliegt, sondern nur einer der beiden Stoffe vorhanden ist, dessen HI dann der Bestimmung zu Grunde zu legen ist. Zwar wurde bei eigenen Untersuchungen in allen untersuchten Auszügen nur natives Saponin und kein Aescin gefunden, eine Umwandlung von nativem Saponin in Aescin



Infrarot-Spektrogramme
von Tiglinsäure, Aescin, Aescinol und Aescinol-Kalium
- KBr-Pressling (3 mg Subst./1 g KBr), NaCl-Prisma -

während der Aufbereitung der Samen oder Zubereitung galenischer Präparate erscheint jedoch durchaus denkbar.

Die in der älteren Literatur genannten Hämolyse-Werte weichen schon in der Grössenordnung erheblich von den vorstehend genannten ab. So wird für "Rosskastaniensaponin MERCK" (S.34) ein HI von 22.ooo angegeben (62). KOFLER (69) nennt für Rosskastaniensaponin einen HI von 9.5oo - 12.ooo, WINTERSTEIN (4o) 5o.ooo. Diese Zahlen sind ein Beweis, dass den Autoren keine reinen Substanzen vorgelegen haben.

Aescinol, Aescinol-Kalium und Aescinolgenin besitzen keine hämolytische Wirksamkeit.

Wenn FIEDLER (55) dem von ihm dargestellten "Aescigenin" eine hämolytische Wirkung zuschreibt, so mag das daran liegen, dass infolge relativ milder Hydrolysebedingungen das Genin noch Aescin enthielt.

2.1.3. Papierchromatographie.

Bei diesen Untersuchungen wurden stets die gleichen Bedingungen eingehalten :

Raumtemperatur 2o°,
aufsteigende Methode,
Äquilibrationszeit 6 Stunden,
Papier S+S 2o43 a bei Anwendung von Blut,
Papier S+S 2o43 b mgl bei Besprühen mit Chemikalien,
Fliessmittel Butanol (MERCK 9628) - Eisessig (MERCK 6o) - Wasser, 4:2:1,
UV-Lampe = PHILIPS Philora.

Als Sprühreagenz wurde zunächst Antimon(III)-chloridlösung (gesättigt in Chloroform) verwendet. Das Chromatogramm wurde nach dem Besprühen kurz im Trockenschrank bei 1oo° getrocknet. Es konnten dann, besonders unter der UV-Lampe, Triterpenoide und Flavonoide gleichzeitig erkannt werden. Jedoch trat als Nachteil auf, dass die Chromatogramme mit der Zeit brüchig wurden.

Später wurden getrennte Methoden der Sichtbarmachung angewendet. Interessierten besonders die Flavonoide, so wurde mit Flavognost-Stammlösung (S.73) besprüht und anschliessend bei

100° im Trockenschrank getrocknet (S103). Interessierten jedoch die Triterpenoide, so wurde mit einer 25 %igen äthanolischen Lösung von Kieselwolframsäure (MERCK 659) besprüht und anschliessend 1-2 Minuten im Trockenschrank bei 115°-118°getrocknet, eine Methode, die von PASICH (176) für einige Triterpenoidsäuren beschrieben wurde. Die Zeit musste genau eingehalten werden, da schon bei geringfügiger Zeitüberschreitung eine allgemeine Braunfärbung des Papiers eintrat. Diese Chromatogramme waren auch über längere Zeit gut haltbar.

Es gelang auch, Flavonoide und Triterpenoide gleichzeitig sichtbar zu machen mit einer Mischung von Flavognost- und Kieselwolframsäurelösung. Das Trocknen erfolgte dann wie beim Triterpenoidnachweis. Jedoch musste bei dieser Methode in Kauf genommen werden, dass die besonders charakteristischen Fluoreszenzerscheinungen der Flavonoide verschwanden, die nach Besprühen mit Flavognostlösung und Betrachten unter der UV-Lampe auftraten.

Zur Detektion der Chromatogramme wurde auch die hämolytische Wirksamkeit des Aescins uns des Aesculus-Saponins ausgenutzt. Zunächst wurde aus frischem Rinderblut nach der PHARMACOPOEA HELVETICA (13) ein Blut-Zitrat-Gemisch hergestellt und dieses 1:1o mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Diese Aufschwemmung wurde zum Besprühen benutzt.

Das frisch besprühte Chromatogramm wurde dann in einer feuchten Kammer senkrecht ohne Wandberührung aufgehängt. Dabei begann sich bei Vorliegen von Aescin oder nativem Saponin bereits nach etwa 5 Minuten ein hämolytischer Hof auszubilden, der im Laufe der folgenden Stunden immer stärker hervortrat. Nach etwa 1o Stunden wurde das Chromatogramm bei Zimmertemperatur vorgetrocknet und dann zum Nachtrocknen zwischen die Seiten eines Buches gelegt.

Eine andere Möglichkeit, die hämolytische Wirksamkeit eines Stoffes für papierchromatographische Zwecke auszunutzen, besteht im Einlegen der Chromatogramme zwischen Blutgelatineplatten. Jedoch erwies sich dieses Verfahren als umständlicher und wurde wieder aufgegeben. Ausserdem können im Gegensatz zu den mit Blut besprühten Papierchromatogrammen die Blutgelatineplatten nur eine begrenzte Zeit aufbewahrt werden.

2.1.3.1. Untersuchung von Reinsubstanzen.

Es wurden zunächst die gewonnenen Reinsubstanzen unter den beschriebenen Bedingungen (S.5o) papierchromatographisch auf ihre Reinheit geprüft. Nach der Behandlung mit Kieselwolframsäurelösung fand sich jeweils nur e i n Farbfleck. Gemessen wurde bis zur Mitte des Fleckes. Es wurden folgende Färbungen und R_F-Werte beobachtet, wobei die Zahlen den Durchschnittswert aus etwa 1o Bestimmungen darstellen :

Aescin	: kirschrot-violett,	R_F 0,7o
Aescinol (=Säure)	: orangerot ,	R_F 0,52
Aescinol-Kalium	: orangerot ,	R_F 0,5o
Genin (=Aescinolgenin)	: orangerot ,	R_F 0,9o.

Die orangeroten Farbflecke waren nur wenige Stunden stabil und dunkelten später nach, wodurch sie dann nicht mehr farbmässig sondern nur noch durch den verschiedenen R_F-Wert vom Aescin-Fleck zu unterscheiden waren.

Die Nachweisgrenze für Aescin lag bei Behandlung mit Kieselwolframsäurelösung im Tüpfeltest bei etwa 1 µg, auf dem Chromatogramm bei etwa 1o µg.

Bei Behandlung mit Blutaufschwemmung lag die Nachweisgrenze für Aescin auf dem Chromatogramm unter 1o µg. Die anderen Reinsubstanzen ergaben keinen hämolytischen Hof. Zu beachten ist hier der durch die andere Papiersorte bedingte höhere R_F-Wert für Aescin von 0,75. (Abb.1 S.56 und Abb.2 S.57).

2.1.3.2. Untersuchung von unbehandelten Aesculus-Auszügen.

Bei der Untersuchung von Aesculus-Auszügen zeigte sich, dass die R_F-Werte des in den Auszügen enthaltenen nativen Saponins stets etwas niedriger (0,62) als die des reinen Aescins (0,7o) lagen, während sich hinsichtlich der Farbtönung nach Behandlung mit Kieselwolframsäurelösung kein Unterschied zeigte. Der Unterschied in den R_F-Werten wurde bisher noch nicht beschrieben. Es erklärt sich aus den aufgezeigten Unterschieden zwischen Aescin und dem nativen Saponin (S.19,2o).

Dieser Unterschied in den R_F-Werten zeigte sich auch bei Verwendung einer anderen Papiersorte (S.5o) und Besprühen mit Blut. Hier wurde für Aescin ein R_F-Wert von 0,75 und für natives Sa-

ponin ein R_F-Wert von 0,68 ermittelt.

Abb.2 (S.57) zeigt das mit Blut besprühte Papierchromatogramm von je 1oo µg Reinsubstanzen und je 1o µl einiger Aesculus-Auszüge. Aescinol und Aescinolgenin gaben keinen hämolytischen Hof.

Abb.3 (S.58) und Abb.4 (S.59) zeigen die mit Kieselwolframsäurelösung besprühten Papierchromatogramme folgender Auszüge und Reinsubstanzen :

1 = Auszug C/IV/8o
2 = " A/V/1oo/S
3 = Auszug A/V/1oo/1
4 = Aesculus Ø HAB
5 = Aescin (bei Abb.4 ausserdem auch Aescinol u. Aescinolgenin)
6 = Venoplant(R) Tropfen
7 = Venostasin(R) Inj.Lsg.
8 = " Tropfen

Von den Reinsubstanzen wurden jeweils 5o µg, von den Auszügen 1o µl aufgetragen.

In den untersuchten selbstbereiteten Auszügen und Handelspräparaten wurde bei den aufgetragenen Mengen von jeweils 1o µl nur natives Saponin nachgewiesen, dagegen kein Aescin sowie kein Aescinol und kein Aescinolgenin.

Hinsichtlich der Intensität der Farbflecke war zwischen den selbstbereiteten Auszügen kein Unterschied festzustellen. Den intensivsten Farbfleck ergab die homöopathische Urtinktur, während die untersuchten Handelspräparate dagegen bedeutend abfielen.

Bei homöopathischen Dilutionen lag die papierchromatographische Nachweisgrenze für Aesculus-Saponin nach Besprühen mit Kieselwolframsäurelösung bei D2 (Abb.5,S.6o), nach Besprühen mit Blut bei D1 (Abb.6,S.61). Aufgetragen wurden jeweils 1o µl.

Beim Vergleich dieser Nachweisgrenzen in Abhängigkeit von der Methode der Detektion mit denen für reines Aescin (S.52) ergibt sich, dass eine Umkehrung der Verhältnisse vorliegt, was auf die unterschiedliche hämolytische Wirksamkeit zwischen Aescin und nativem Saponin (S.48) hindeutet.

Zu erwähnen sind noch einige graue Farbflecke zwischen den R_F-Werten 0,1 und 0,3, die nach Behandlung mit Kieselwolframsäurelösung auf den Chromatogrammen bei selbstbereiteten Auszügen (Abb.3 u.4), bei homöopathischen Zubereitungen (Abb.3,4

u.5) und bei einigen Handelspräparaten (Abb.3,4,7 u.8) auftraten. Es ist anzunehmen, dass diese Farbflecke, die noch keinem Inhaltsstoff zugeordnet wurden, in Beziehung zu den von FIEDLER (55) als "Substanz X" bezeichneten Stoffen stehen. Hämolytische Höfe gab diese "Substanz X" nicht.

Zur Prüfung, ob Aescin neben nativem Saponin papierchromatographisch nachweisbar ist, wurde einer Aescinlösung Venostasin$^{(R)}$Injektionslösung zugesetzt. Das Mischungsverhältnis wurde so gewählt, dass das aufgetragene Volumen von 15 µl genau 5o µg Aescin und 1o µl der Injektionslösung enthielt. Verglichen wurde mit 1oo µg und 1o µg Aescin sowie 1o µl reiner Injektionslösung, die getrennt aufgetragen wurden.

Es zeigten sich (Abb.8, S.63) nach dem Besprühen mit Kieselwolframsäurelösung bei 2) zwar keine getrennten Farbflecke, jedoch war an der Form, Lage und Ausdehnung des Farbfleckes zu erkennen, dass eine Mischung von Aescin und nativem Saponin vorlag und auch als solche zu erkennen ist.

1 = Aescin 1oo µg
2 = " 5o µg + Venostasin$^{(R)}$Inj.Lsg. 1o µl
3 = Venostasin$^{(R)}$Inj.Lsg. 1o µl
4 = Aescin 1o µg

Ausserdem ist auf diesem Chromatogramm (Abb.8) nochmals der Unterschied der R_F-Werte von Aescin und nativem Saponin zu erkennen.

2.1.3.3. Untersuchung von vorbehandelten Aesculus-Auszügen.

In der Literatur wird dem Aesculus-Saponin ein Cholesterinbindungsvermögen teils abgesprochen (35,17o), teils zugesprochen (59).

In einigen Patenten (167,168,169) werden Verfahren beschrieben, nach denen zur Herstellung injizierbarer Extrakte das Saponin aus den Primär-Extrakten entfernt werden soll. Alle diese Verfahren nutzen das Cholesterinbindungsvermögen der Saponine aus, das zuerst von WINDAUS beim Digitonin beobachtet wurde.

Es schien interessant zu untersuchen, ob diese Verfahren bzw. das Cholesterinbindungsvermögen des Aesculus-Saponins ausreichen, um Injektionslösungen herzustellen, die keine hämoly-

tische Wirkung zeigen sollen. Denn wie in einem der Patente (167) hervorgehoben wird, ist eine i.v. Applikation nur möglich, wenn die hämolytische Wirkung der Saponine beseitigt ist.

Papierchromatographisch wurde festgestellt, dass ein aus dem Handel bezogener Rosskastanienextrakt zur Injektion noch hämolytisch wirksames Saponin enthielt, obwohl die entsprechende Patentschrift (167) die i.v. Applikation hämolytisch wirksamer Extrakte ausdrücklich ausschliesst.

Der Nachweis, bereits im vorigen Kapitel erwähnt (Abb.2,S.57), gelang nach dem Besprühen mit Blut. Aufgetragen wurden 1o µl der Injektionslösung.

Ausserdem gelang der papierchromatographische Nachweis von Aesculus-Saponin in Injektionslösungen nach Besprühen mit Kieselwolframsäurelösung (Abb.3,4,7 u.8). Abb.3 und 4 sind bereits beschrieben (S.53), desgleichen Abb.8 (S.54).

Abb.7 (S.62) zeigt das mit Kieselwolframsäurelösung besprühte Chromatogramm von Aescin und zwei Injektionslösungen.
1 = Aescin 1oo µg 2 = Venoplant(R) Inj.Lsg. (Blatt Extr.)
4 = " 1o µg 3 = Venostasin(R) " " (Samen ").
Von den Injektionslösungen wurden je 1o µl aufgetragen. Der Blattextrakt wurde unter den Bedingungen der Methode als saponinfrei befunden.

Auch hier zeigt sich der bereits erwähnte (S.52) Unterschied in den R_F-Werten zwischen Aescin und dem nativen Saponin. Hinsichtlich der Intensität des Farbfleckes von Venostasin(R) Injektionslösung in Abb.7 und auch in den Abb.3,4 und 8 scheint der Saponingehalt dieser Lösung beim Vergleich mit den entsprechenden Farbflecken anderer Auszüge nicht unbedeutend zu sein.

Zu der Diskussion über die Frage, ob das Aesculus-Saponin überhaupt an der klinisch anerkannten Wirksamkeit i.v. zu applizierender Extrakte beteiligt sein kann, muss hier also gesagt werden, dass auch in diesen Injektionslösungen das Saponin einwandfrei nachgewiesen werden kann. Es kann also nicht als Wirkstoff einfach ausgeschlossen werden, weil es "wegen seiner hämolytischen Eigenschaften sorgfältig entfernt werden muss" (32).

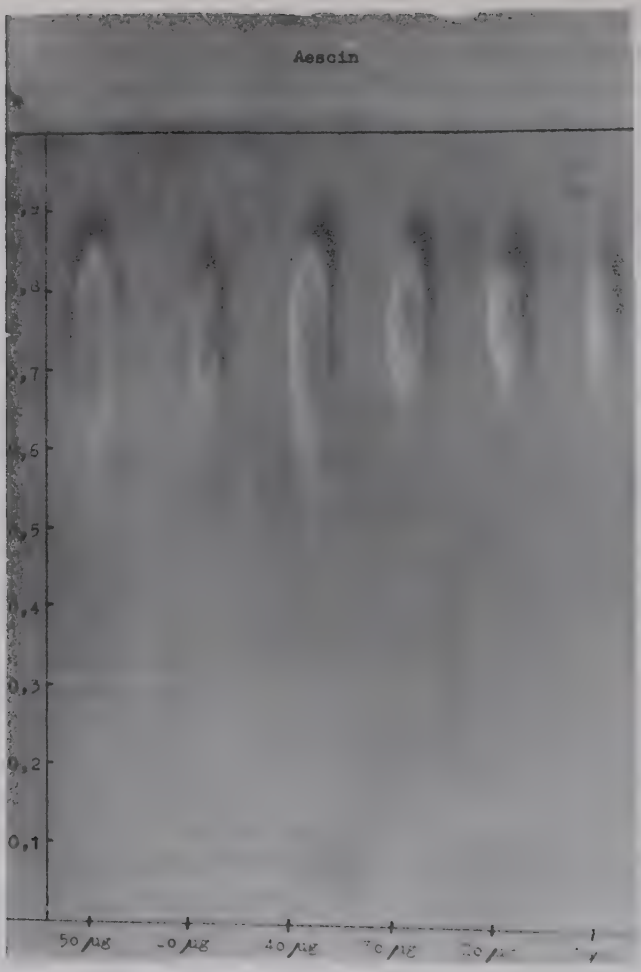


Abb. 1

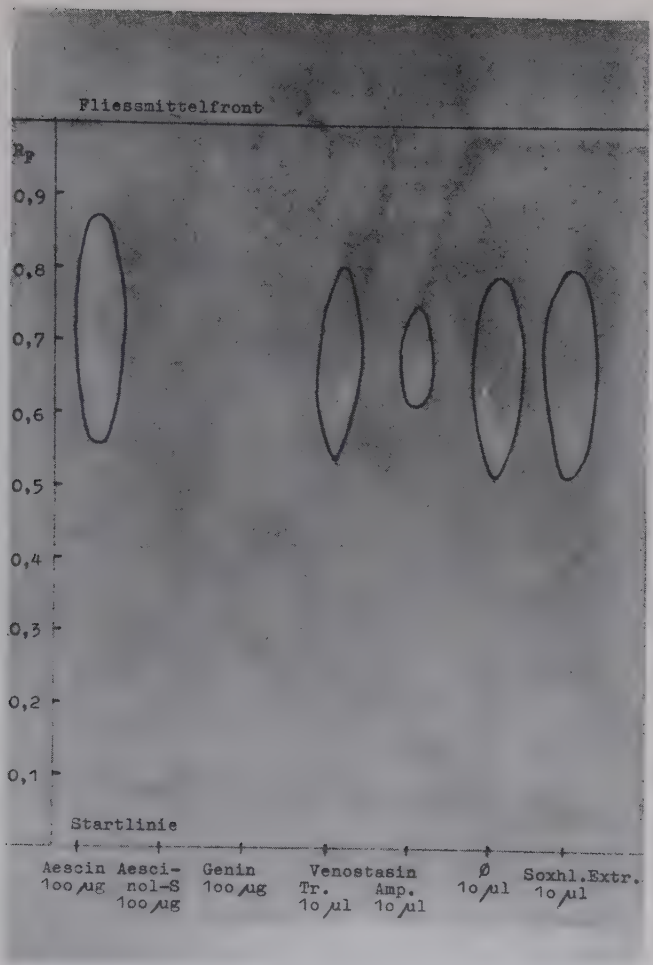

Fliessmittelfront
R_F
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
Startlinie
Aescin 100 µg
Aescinol-S 100 µg
Genin 100 µg
Venostasin Tr. 10 µl
Venostasin Amp. 10 µl
Ø 10 µl
Soxhl.Extr. 10 µl

Abb. 2

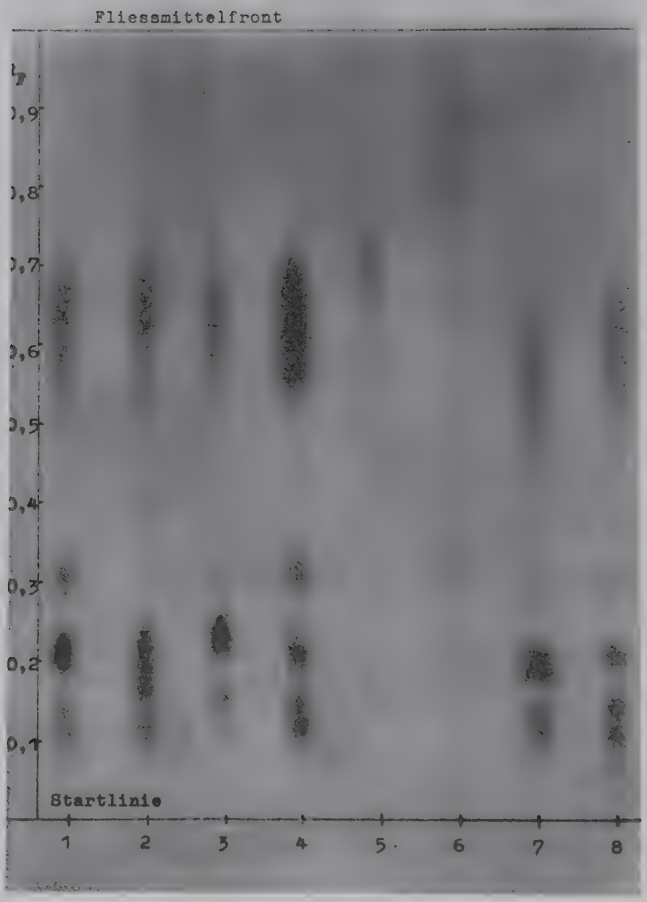

Fliessmittelfront
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
Startlinie
1
2
3
4
5
6
7
8

Abb. 3

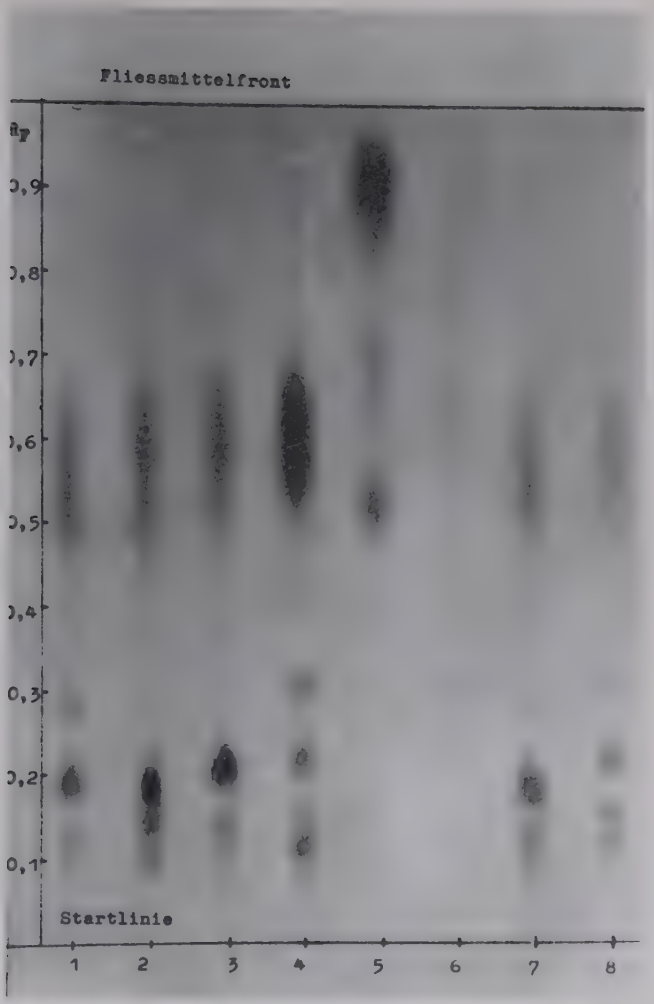

Fliessmittelfront
R_F
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
Startlinie
1
2
3
4
5
6
7
8

Abb. 4

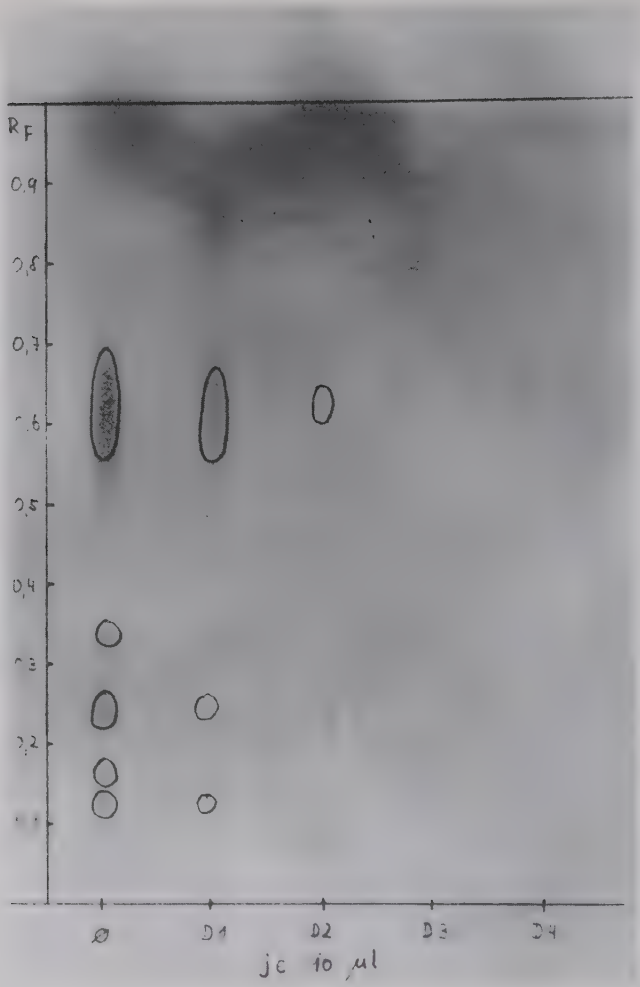


Abb. 5

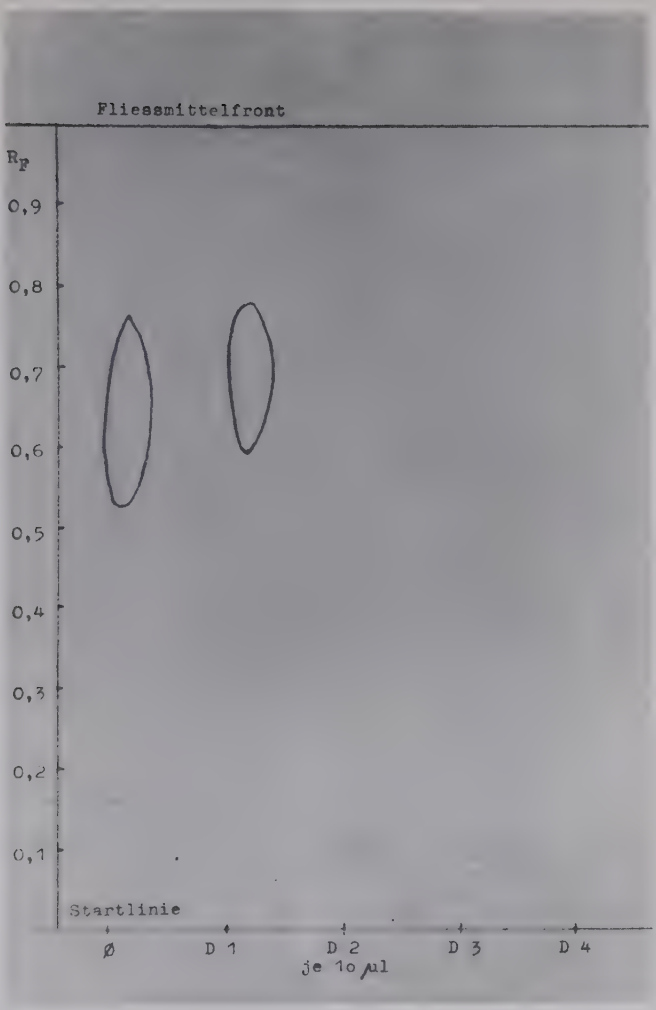

Fliessmittelfront
R_F
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
Startlinie
Ø
D 1
D 2
D 3
D 4
je 10 µl

Abb. 6

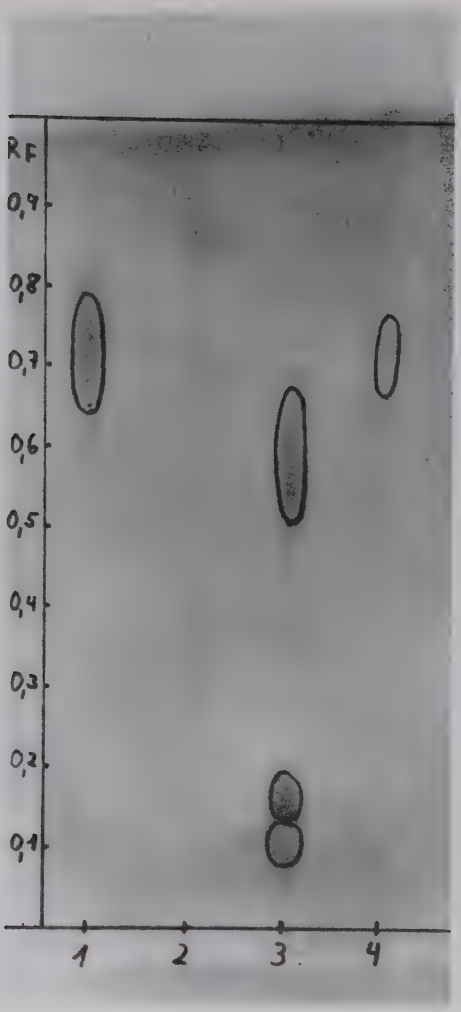


Abb. 7

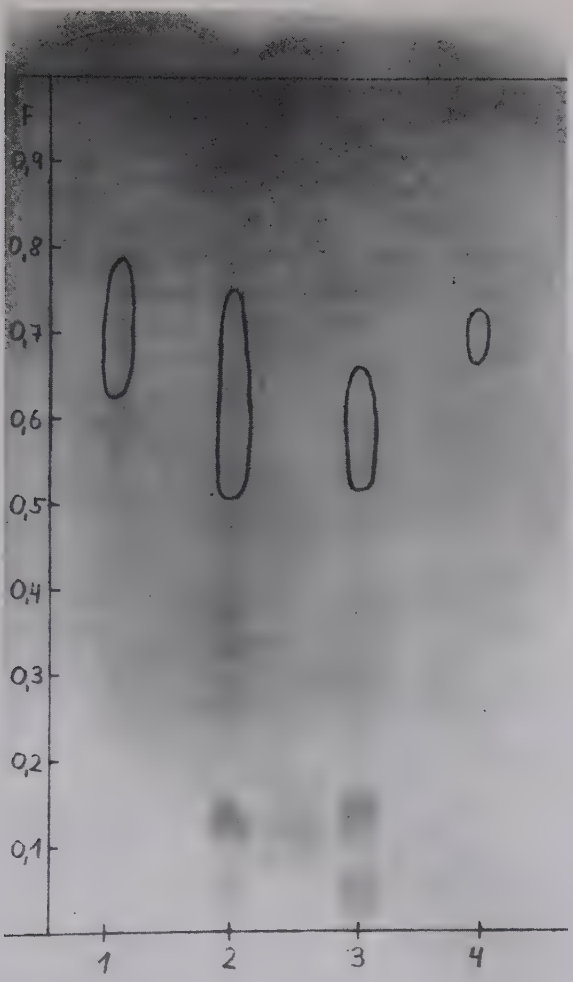


Abb. 8

2.1.4. Dünnschichtchromatographie.

Es wurde zunächst die von STAHL (171) angegebene eluotrope Reihe durchgegangen. Eine befriedigende Auftrennung der aufgetragenen Aesculus-Auszüge konnte jedoch auch mit den polaren Lösungsmitteln Äthanol, Methanol, Pyridin und Mischungen dieser Flüssigkeiten nicht erzielt werden.

Sodann wurde die aus der Papierchromatographie bewährte Mischung von Butanol, Eisessig und Wasser (4:1:2) angewendet (S.5o). Jedoch wurden die Glasplatten nach dem Bestreichen mit der wässrigen Kieselgel-Anreibung nicht im Trockenschrank in der Hitze getrocknet sondern 3 Stunden bei Zimmertemperatur offen ausgelegt. Die wassergesättigten Schichten in Verbindung mit der Mischung Butanol-Eisessig-Wasser ermöglichten eine befriedigende Trennung der aufgetragenen Auszüge. Jedoch handelte es sich jetzt nicht mehr um eine Adsorptions- sondern wie bei der Papierchromatographie um eine Verteilungschromatographie.

Nachteilig wirkte sich jedoch aus, dass bei polaren Lösungsmitteln und besonders bei wasserhaltigen Mischungen die Kieselgel-Schichten sich leicht von den Glasplatten lösten. Auch sind in diesem Falle die Laufzeiten für eine Laufstrecke von 1o cm bedeutend grösser (2-3 Stunden) als bei unpolaren Lösungsmitteln (2o-4o Minuten). Die im Verhältnis zu den papierchromatographischen Untersuchungen geringe Laufstrecke liess auch nur eine entsprechend geringere Auftrennung zu.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Dünnschichtchromatographie bei den vorliegenden Untersuchungen keine Vorteile gegenüber der Papierchromatographie zeigte.

2.1.5. Photometrie.

Es sollte versucht werden, spezifische Farbreaktionen zunächst für reines Aescin zu finden, diese in quantitativer Hinsicht zu untersuchen und ihre Eignung zur Bestimmung von Aescin in Aesculus-Auszügen zu ermitteln.

2.1.5.1. Reaktion mit Chlorsulfonsäure.

BRIESKORN und BRINER (172) beschrieben ein Verfahren zur photometrischen Bestimmung der Triterpenoide Ursolsäure und Oleanolsäure. Nach unbefriedigenden Versuchen mit der Reaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD gingen die Verfasser auf die Verwendung reiner Chlorsulfonsäure über. Dieses Verfahren wurde in etwas abgewandelter Form hier für Aescin untersucht.

Von einer methanolischen Aescinlösung 1:1oo wurden 1,5 ml in ein Kölbchen pipettiert und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand, 15 mg Aescin, wurde unter Eiskühlung des Kölbchens mit 1 ml Chlorsulfonsäure (MERCK 22o) versetzt, wobei die Mischung eine braune Farbe annahm. Nach genau 5 Minuten wurde zunächst tropfenweise, dann in Anteilen unter Eiskühlung, mit 1o ml eiskaltem Wasser versetzt, was in 3 Minuten beendet war. Es entstand eine graugrüne, trübe Mischung. Genau 5 Minuten nach Beginn der Wasserzugabe wurden 1o ml Isopropanol (MERCK 9634) hinzugefügt, wobei eine klare gelbe Lösung entstand.

Ein Ausschütteln des Reaktionsproduktes, wie nach BRIESKORN und BRINER, hatte keinen Erfolg. In chlorierten Kohlenwasserstoffen war der entstandene Farbstoff unlöslich, mit höheren Alkoholen fand eine Emulsionsbildung statt.

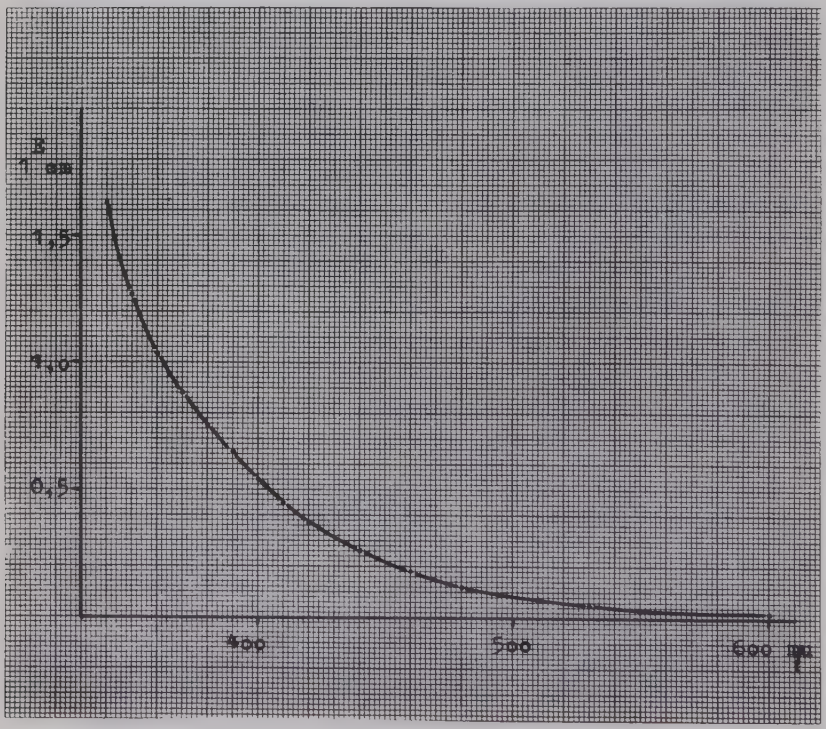
Die gelbe Farblösung wurde im BECKMAN-Spektralphotometer Modell-DU zwischen 34o mμ und 6oo mμ in einer 1-cm-Küvette durchgemessen. Als Blindlösung diente eine unter gleichen Bedingungen hergestellte Mischung von Chlorsulfonsäure, Wasser und Isopropanol.

Die Extinktionskurve (S.66) ergab kein Absorptionsmaximum innerhalb des gemessenen Spektralbereiches von 34o mμ bis 6oo mμ. Aus diesem Grunde wurden die Untersuchungen mit dieser Reaktion nicht weitergeführt.

Auch BRIESKORN und BRINER (172) hatten bei ihren Untersuchungen über Ursolsäure und Oleanolsäure mit der entsprechenden Reaktion kein Absorptionsmaximum im entsprechenden Spektralbereich beobachtet.

mμ	340	350	360	370	380	390	400
E	1,630	1,270	1,040	0,878	0,752	0,649	0,542

mμ	410	420	440	460	480	530	600
E	0,452	0,377	0,262	0,183	0,124	0,054	0,023



Tab. 1

2.1.5.2. Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd-Eisessig--Schwefelsäure.

Auf Grund systematischer Untersuchungen aller in der Literatur erreichbarer qualitativer und zum Teil auch quantitativer Farbreaktionen der Triterpenoide erwies sich für Aescin lediglich die von GERLACH (173) für qualitative Untersuchungen einiger Triterpenoide kurz angegebene Reaktion, wobei Aescin jedoch nicht genannt wird, auch für quantitative Bestimmungen geeignet. Diese qualitative Farbreaktion wurde nun zu einer quantitativen Methode ausgebaut.

2.1.5.2.1. Reagenzlösung.

0,5 g p-Dimethylaminobenzaldehyd (MERCK 3o38) wurden in 1oo ml Essigsäure (MERCK 6o) gelöst. Unter Kühlung wurden aus einer Pipette 2o ml Schwefelsäure (MERCK 731) in Anteilen unter Umschwenken zugegeben. Diese Reagenzlösung wurde täglich frisch bereitet und gut verschlossen aufbewahrt.

2.1.5.2.2. Aescin-Stammlösung.

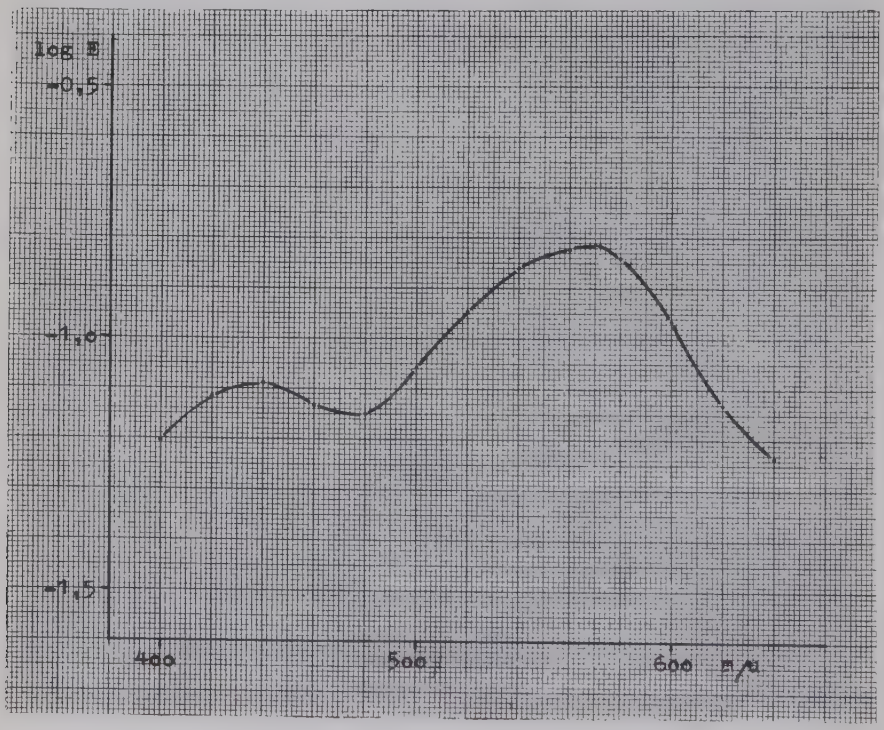
2,5 g Aescin wurden genau gewogen, in Methanol (MERCK 6oo9) gelöst und auf 5oo ml aufgefüllt. 1 ml dieser Lösung enthielt dann 5 mg Aescin.

2.1.5.2.3. Aufstellen der typischen Farbkurve.

1 ml Aescin-Stammlösung wurde in einen 5o-ml-Schliffkolben pipettiert und zur Trockne eingedampft. 1o ml Reagenzlösung wurden in den erkalteten Kolben pipettiert, der dann sofort bei 4o,o°C im Wasserbad mit Thermostat für genau 2o Minuten erwärmt wurde. Nach etwa 5 Minuten nahm die Lösung einen leicht violetten Farbton an, der sich mit der Zeit verstärkte. Nach 2o Minuten wurde der Kolben dem Wasserbad entnommen und genau 5 Minuten lang unter fliessendem Wasser abgekühlt. Nach weiterem 5-minütigem Akklimatisieren bei Zimmertemperatur wurden innerhalb von 15 Minuten die Messungen im BECKMAN-Spektralphotometer Modell-DU zwischen 4oo mμ und 64o mμ unter Verwendung von 1-cm-Küvetten durchgeführt. Als Blindlösung dienten 1o ml Reagenzlösung, entsprechend der Reaktionslösung behandelt. Die typische Farbkurve ergab 2 Maxima (Tab.2 S.68).

mμ	400	420	440	460	480	500	520
E	0,063	0,077	0,082	0,074	0,071	0,088	0,113
log E	-1,201	-1,114	-1,086	-1,131	-1,149	-1,056	-0,947

mμ	540	560	570	580	600	620	640
E	0,138	0,151	0,154	0,145	0,109	0,074	0,058
log E	-0,860	-0,821	-0,813	-0,839	-0,963	-1,131	-1,237



Tab. 2

2.1.5.2.4. Aufstellen der Eichkurve.

Von den beiden Maxima der typischen Farbkurve (Tab.2 S.68) erwies sich das bei 57o mμ ausgeprägter und für die folgenden Messungen im LEITZ-Kompensationsphotometer geeigneter.

Steigende Volumina der Aescin-Stammlösung, 5-3o mg Aescin enthaltend, wurden eingedampft und wie vorstehend beschrieben mit je 1o ml Reagenzlösung behandelt. Schon visuell war eine Abhängigkeit der Farbintensität von der einpipettierten Aescinmenge zu beobachten. Die Messungen wurden im LEITZ-Kompensationsphotometer mit elektrischer Anzeige unter Verwendung von 1-cm-Küvetten und des Filters 57o durchgeführt. Als Blindlösung diente wiederum eine gleich behandelte Reagenzlösung.

Die gefundenen Extinktionswerte als Mittelwerte mehrerer Bestimmungen lagen innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches auf einer Geraden und entsprachen somit dem Gesetz von LAMBERT-BEER (Tab.3 S.71).

2.1.5.2.5. Untersuchungen über die Reaktionsbedingungen.

Bei genauer Beachtung der angegebenen Bedingungen waren die Werte gut reproduzierbar. Die Farbe, die sich unter diesen Bedingungen gebildet hatte, war jedoch nicht sehr stabil. Im Verlauf mehrerer Stunden nahm die zunächst violette Lösung eine mehr und mehr blaue Farbe an, wobei die Extinktion bei 57o mμ laufend anstieg. Diese Farbänderung war bei Abwesenheit von Tageslicht am wenigsten ausgeprägt.

Um den Einfluss dieser Farbänderung möglichst weitgehend auszuschalten, wurden die Reaktionen und Messungen in einem Kellerraum bei nur schwacher künstlicher Beleuchtung durchgeführt. Ausserdem wurden die angegebenen Zeiten für Reaktion und Messungen (S.67) genau eingehalten.

Wichtig war auch die peinliche Sauberkeit der verwendeten Glasgeräte, die vollkommene Abwesenheit von Wasser und Lösungsmitteln sowie die stete Verwendung derselben Reagenzien. Bei Verwendung von Essigsäure MERCK 61 (Gehalt 96-99 %) wurde eine Mischfarbe erhalten, desgleichen bei Verwendung von nicht einwandfrei gesäuberten Glasgeräten. Bei Anwesenheit geringer Mengen Wasser oder Methanol, hervorgerufen

durch nicht vollständiges Eindampfen der Aescin-Stammlösung, entstand gleichfalls eine Mischfarbe. Bei nachträglichem Zusatz von Alkoholen ging die Violettfärbung in eine Grünfärbung über. Um jeglichen Zutritt von Wasser oder Wasserdampf auszuschalten, wurden die Reaktionen nur in Schliffkolben bei aufgesetzten Stopfen durchgeführt.

Versuche über die geeignete Schwefelsäure-Konzentration in der Reagenzlösung ergaben, dass bei einem geringeren Anteil an Schwefelsäure eine weniger intensive Färbung entstand, was jedoch durch längeres Erwärmen im Wasserbad oder Erwärmen bei höherer Temperatur kompensiert werden konnte. Bei einem höheren Schwefelsäureanteil waren die Verhältnisse umgekehrt.

Der Versuch, die Schwefelsäure durch Phosphorsäure zu ersetzen, wie von GERLACH (173) bei anderen Triterpenoiden beschrieben, hatte keinen Erfolg.

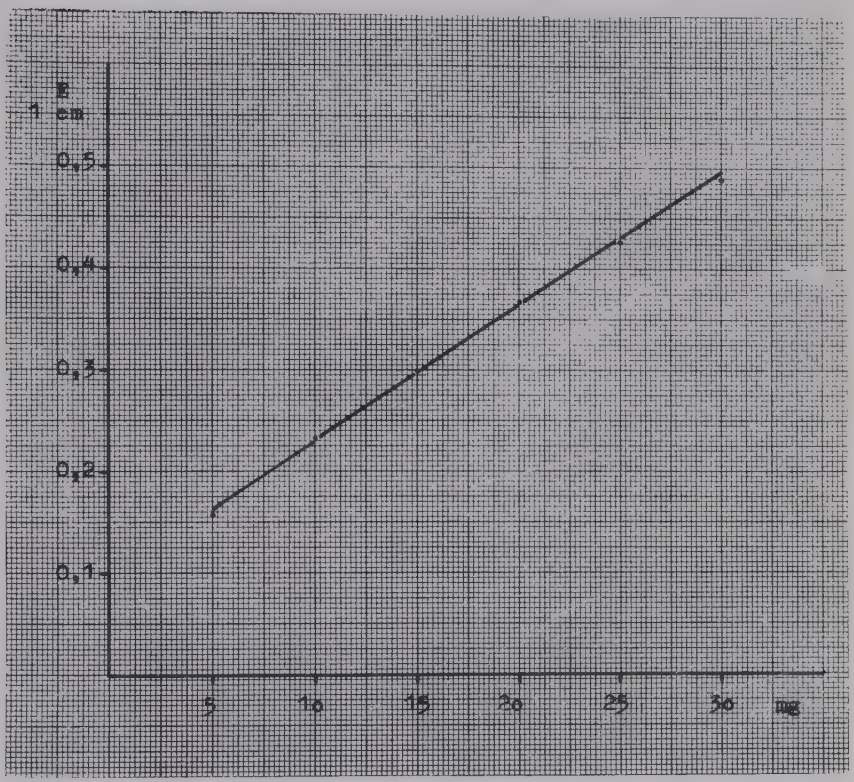
Bei Verwendung von Essigsäureanhydrid an Stelle von Essigsäure verlief die Farbbildung schneller und intensiver, jedoch auf Kosten der Stabilität.

Beim Fortlassen des p-Dimethylaminobenzaldehyd entstand eine rotbraune Mischfarbe, die bald in eine braune Farbe überging.

Um zu entscheiden, welcher Teil des Aescinmoleküls für die Farbbildung verantwortlich war, wurden auch Aescinol, Aescinolgenin, Glukose und Glukuronsäure sowie die als Spaltstücke diskutierten Verbindungen Tiglinsäure und Xylose den Bedingungen der Reaktion unterworfen. Dabei gaben Aescinol und Aescinolgenin eine Rotviolettfärbung, Glukose eine schwache Rotfärbung. Die übrigen Stoffe zeigten keine Farbreaktion. Hieraus dürfte zu schliessen sein, dass bei der Farbreaktion sowohl das kondensierte Ringsystem des Aescins als auch die glykosidisch gebundene Glukose als Reaktionspartner fungieren.

Es wird angenommen, dass p-Dimethylaminobenzaldehyd als Intensivator und Stabilisator bei einer Farbreaktion wirkt, die Ähnlichkeit mit der Reaktion nach LIEBERMANN-BURCHARD besitzt. Über den Mechanismus der Letzteren haben sich BRIESKORN und Mitarbeiter geäussert (174,178). Danach soll für die Farbentstehung die Gegenwart von konz. Schwefelsäure wichtig sein.

mg	5	1o	15	2o	25	3o
E	0,157	0,234	0,3oo	0,367	0,427	0,49o



Tab. 3

2.1.5.3. Reaktion mit Kieselwolframsäure.

Eine unlängst von TAKAMURA+ beschriebene Farbreaktion einiger Triterpenoide (ohne Aescin) mit Kieselwolframsäure (177) konnte nach Vorliegen der Unterlagen in die Untersuchungen einbezogen werden. Es zeigte sich jedoch, dass nach den Vorschriften von TAKAMURA keine verwertbare Farbreaktion für Aescin erhalten wurde. Die Anfärbung auf dem Papierchromatogramm, von TAKAMURA für eine Reihe von Triterpenoiden (ohne Aescin) beschrieben, war jedoch schon bekannt (S.51).

2.1.6. Versuche zur chromatographischen Auftrennung der Aesculus-Auszüge.

Es sollte versucht werden, aus Aesculus-Auszügen das Saponin chromatographisch abzutrennen und mittels der beschriebenen Farbreaktion auf Aescin photometrisch zu bestimmen. Diese Versuche hatten jedoch keinen Erfolg.

Zunächst wurden bekannte Mengen Aescin auf eine Aluminiumoxyd- bzw. Kieselgelsäule gegeben und durch Nachwaschen versucht, das Aescin quantitativ zu eluieren. Es gelang zwar, mit dem Abdampfrückstand des Eluats eine Aescin-Farbreaktion zu erhalten, jedoch wurde ein Teil des eingesetzten Aescins hartnäckig von den Adsorbentien festgehalten trotz vollkommener Desaktivierung der Adsorbentien und Verwendung stark polarer Lösungsmittel.

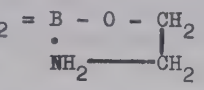
Dann wurde eine papierchromatographische Auftrennung durch Anfertigung von Strichchromatogrammen versucht. Die durch vorherige Untersuchungen (S.5o ff.) bekannte Saponinzone wurde herausgeschnitten und mit Methanol im Mikrosoxhlet extrahiert. Dieser Extrakt wurde eingedampft und der Rückstand der Farbreaktion auf Aescin unterworfen.

Selbst bei aufgetragenem reinem Aescin wurde auf diese Weise keine reine Violettfärbung erhalten. Es wird angenommen, dass durch das Extrahieren der Papierstreifen Stoffe aus dem Papier in Lösung gehen, die mit dem Reagenz eine Mischfarbe ergeben. Die gleiche Erscheinung wurde in verstärktem Masse bei der Strichchromatographie von Aesculus-Auszügen beobachtet.

+Herrn Prof. Takamura/Tokyo sei für die Übersendung der Originalarbeiten und der englischen Übersetzung herzlich gedankt.

2.2. Bestimmung von Flavonoiden mit Flavognost.

An Stelle von Tetraphenyl-diboroxyd (S.3o) wird vom gleichen Hersteller unter der Bezeichnung "Flavognost" ein Diphenylborsäure-aminoäthylester-komplex



in den Handel gebracht, der sich durch grosse Stabilität auszeichnen und hinsichtlich der Reaktionsschärfe die gleiche Signifikanz wie Tetraphenyl-diboroxyd aufweisen soll (1o5). Dabei kommen 2 Mol Flavognost an Stelle von 1 Mol Tetraphenyl-diboroxyd zur Anwendung, was einem Gewichtsverhältnis von 1,3 : 1 entspricht.

Flavognost ist ein weisses, aromatisch riechendes Pulver, leicht löslich in Methanol. Diese Lösung ist farblos.

Das Reaktionsvermögen von Flavognost ist bisher wenig untersucht (1o5), es ist aber nicht auf Flavonoide beschränkt. So lassen sich z.B. auch Tetracycline bestimmen (179), deren Chelatbildungsvermögen mit Titan- und Zirkon-Salzen bereits beschrieben wurde (18o).

Nach NEU (1o3) ist für den Flavonoidnachweis mit Tetraphenyl-diboroxyd dieses in etwa der 5-fachen Gewichtsmenge des Flavonoids zur Anwendung zu bringen, was einer 6,5-fachen Menge an Flavognost entspricht.

Für die folgenden Untersuchungen wurde eine Flavognost-Stammlösung verwendet, die durch Auflösen von 65 mg Flavognost in Methanol (MERCK 6oo9) und Auffüllen auf 1oo ml hergestellt wurde. 1 ml dieser Lösung enthielt 0,65 mg Flavognost.

2.2.1. Untersuchungen mit Reinsubstanzen.

Als Reinsubstanzen wurden Rutin, Quercitrin und Quercetin verwendet, die aus dem Handel bezogen wurden.

Zur orientierenden qualitativen Prüfung wurden einige

Milligramm der jeweiligen Reinsubstanz im Reagenzglas in einigen Millilitern Methanol gelöst. Es entstand eine schwach gelblich gefärbte Lösung. Nach Zugabe einiger Milligramm Flavognost nahm jede der drei Flavonollösungen, fortschreitend mit der Lösung des Flavognost, eine immer stärker werdende Gelbfärbung an. Wurde das Flavognost in Form der beschriebenen Stammlösung zugesetzt, so entstand die Farbverstärkung sofort.

Vor der Durchführung der photometrischen Untersuchungen wurde zunächst geprüft, ob die vorliegenden Reinsubstanzen die für analytische Bestimmungen erforderliche Reinheit besassen und nicht durch andere Flavonoide verunreinigt waren.

Zu diesem Zweck wurden einige Papierchromatogramme angefertigt. Die bereits beschriebenen Bedingungen (S.5o) wurden mit Ausnahme des Fliessmittels eingehalten. Hier wurde die organische Phase einer Mischung Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) verwendet. Nach Besprühen mit Antimon(III)-chloridlösung und Trocknen fand sich beim Betrachten unter der UV-Lampe für Rutin und Quercitrin je ein einziger, wohl definierter, gelb leuchtender Fleck mit dem R_F-Wert 0,48 für Rutin und dem R_F-Wert 0,8 für Quercitrin. Diese beiden Verbindungen waren also nicht durch fremde Flavonoide verunreinigt. Beim Quercetin fand sich jedoch ausser einem leuchtend gelben Fleck mit dem R_F-Wert 0,76 noch ein zweiter schwach ausgeprägter Fleck mit dem R_F-Wert 0,48. Es wurde deshalb vermutet, dass die Handelsware mit Rutin verunreinigt war. Deshalb wurde das Quercetin mehrere Male aus Methanol-Wasser umkristallisiert, bis papierchromatographisch kein Rutin mehr nachgewiesen werden konnte.

2.2.1.1. Bestimmung von Rutin.

Etwa 1 g Rutin wurden nach (9o) im Trockenschrank bei $12o^{o}$-125^{o} bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann im Exsikkator aufbewahrt. 1oo mg hiervon wurden genau in einen Messkolben eingewogen, in etwas Methanol gelöst und dann mit Methanol auf 1oo ml aufgefüllt. Diese Lösung wurde mit Methanol 1:1o verdünnt. 1 ml der Verdünnung, im folgenden

als Stammlösung bezeichnet, enthielten dann 0,1 mg Rutin.

2.2.1.1.1. Aufstellen der typischen Farbkurve.

2 ml Rutin-Stammlösung (=0,2 mg Rutin) und 2 ml Flavognost-Stammlösung wurden in einen 1o-ml-Messkolben pipettiert und vermischt. Die schwach gelblich gefärbte Rutinlösung nahm dabei sofort eine kräftige Gelbfärbung an. Mit Methanol wurde bis zur Marke aufgefüllt.

Diese Lösung wurde im BECKMAN-Spektralphotometer Modell-DU bei Verwendung von 1-cm-Küvetten zwischen 32o mμ und 5oo mμ durchgemessen. Als Blindlösung diente Methanol (Tab.4 S.76).

Es ergab sich ein Absorptionsmaximum bei 4oo mμ, was durch jeweils 3 Bestimmungen mit verschiedenen Rutinmengen festgestellt wurde. Die Extinktion im Maximum bei 4oo mμ betrug für 0,4 mg Rutin das Doppelte, für 0,1 mg die Hälfte der Extinktion für 0,2 mg, was schon einen Hinweis auf die mögliche Anwendung der Methode zu quantitativen Bestimmungen darstellte.

Eine erneute Extinktionmessung bei 4oo mμ nach 24 Stunden ergab bei allen 3 Lösungen (0,1 mg, 0,2 mg, 0,4 mg) annähernd die gleichen Ergebnisse. Die Farblösungen waren also mindestens 24 Stunden stabil.

2.2.1.1.2. Aufstellen einer Eichkurve.

Steigende Volumina der Rutin-Stammlösung, 0,o5 - 0,6 mg Rutin enthaltend, wurden in je einen 1o-ml-Messkolben pipettiert, mit je 4 ml Flavognost-Stammlösung versetzt und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

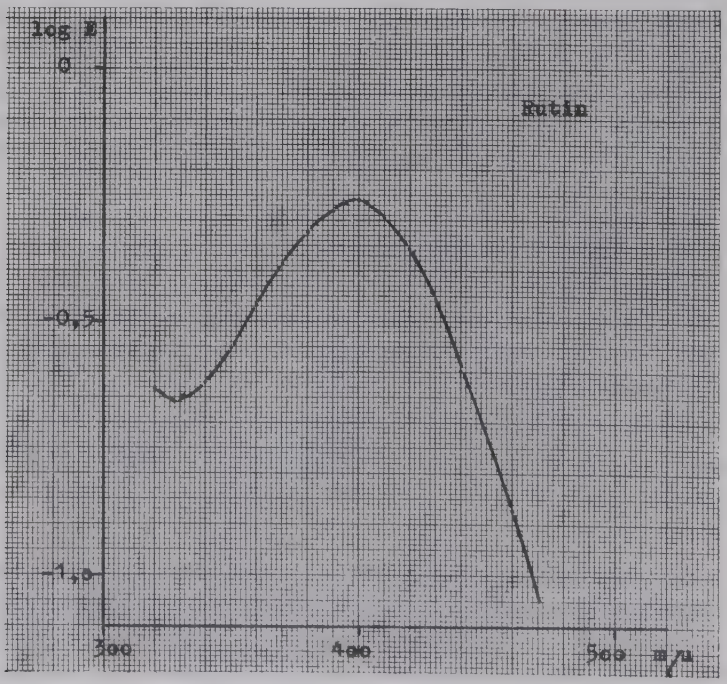
Die Messungen wurden im LEITZ-Kompensationsphotometer mit elektrischer Anzeige unter Verwendung von 1-cm-Küvetten und eines Interferenzfilters 4o5 durchgeführt. Als Blindlösung diente Methanol.

Die gefundenen Extinktionswerte lagen innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches auf einer Geraden und folgten dem Gesetz von LAMBERT-BEER (Tab.5 S.77). Zwar konnte nicht genau im Maximum gemessen werden, da für das Gerät ein Filter 4oo nicht existiert. Der Verlauf der typischen Farbkurve bei 4o5 mμ liess jedoch die Verwendung eines Filters 4o5 gerechtfertigt erscheinen.

mμ	320	330	340	350	360	370
E	0,233	0,220	0,241	0,282	0,341	0,410
log E	-0,633	-0,658	-0,618	-0,550	-0,467	-0,387

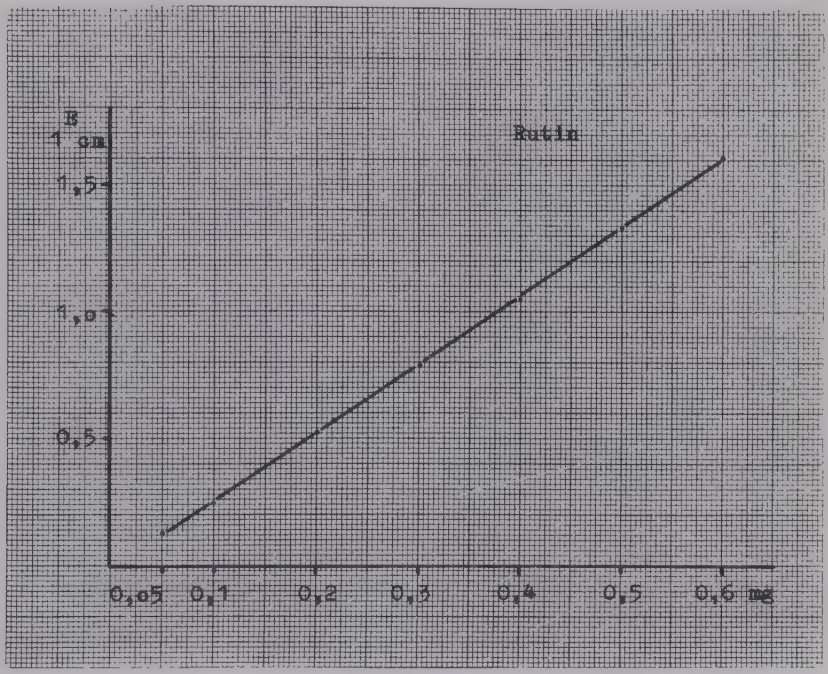
mμ	380	390	395	400	405	410
E	0,478	0,525	0,543	0,551	0,533	0,511
log E	-0,321	-0,280	-0,265	-0,259	-0,273	-0,292

mμ	420	430	440	460	500
E	0,443	0,352	0,252	0,135	0,032
log E	-0,354	-0,454	-0,599	-0,870	-1,495



Tab. 4

mg	0,o5	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
E	0,129	0,25o	0,523	0,794	1,o55	1,338	1,61o



Tab. 5

2.2.1.2. Bestimmung von Quercitrin.

Etwa 1 g Quercitrin wurden nach (181) bei 135° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann im Exsikkator aufbewahrt. Es wurde, analog der Rutin-Stammlösung (S.74), eine Quercitrin-Stammlösung hergestellt, die in 1 ml 0,1 mg Quercitrin enthielt. Diese Lösung war nicht mehr sichtbar gefärbt.

2.2.1.2.1. Aufstellen der typischen Farbkurve.

2 ml Quercitrin-Stammlösung (=0,2 mg Quercitrin) und 2 ml Flavognost-Stammlösung wurden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert und vermischt. Dabei entstand aus den beiden farblosen Stammlösungen eine deutlich gelb gefärbte Lösung. Die Farbe blieb auch nach dem Auffüllen auf 10 ml deutlich erkennbar.

Diese Lösung wurde im BECKMAN-Spektralphotometer Modell-DU bei Verwendung von 1-cm-Küvetten zwischen 330 mμ und 500 mμ durchgemessen. Als Blindlösung diente Methanol.

Es ergab sich ein Absorptionsmaximum bei 390 mμ, was durch eine weitere in gleicher Weise durchgeführte Untersuchung mit 0,1 mg Quercitrin bestätigt wurde.

Tab.6 (S.79) gibt als E 1) die Extinktionen für 0,2 mg Quercitrin, als E 2) die Extinktionen für 0,1 mg Quercitrin wieder, behandelt in der vorstehend beschriebenen Weise. Die entsprechende typische Farbkurve befindet sich auf S.80.

2.2.1.2.2. Aufstellen der Eichkurve.

Steigende Volumina der Quercitrin-Stammlösung, 0,05 - 0,4 mg Quercitrin enthaltend, wurden in je einen 10-ml-Messkolben pipettiert, mit je 4 ml Flavognost-Stammlösung versetzt und mit Methanol bis zur Marke aufgefüllt.

Die Messungen wurden im BECKMAN-Spektralphotometer Modell-DU unter Verwendung von 1-cm-Küvetten bei 390 mμ durchgeführt. Als Blindlösung diente Methanol.

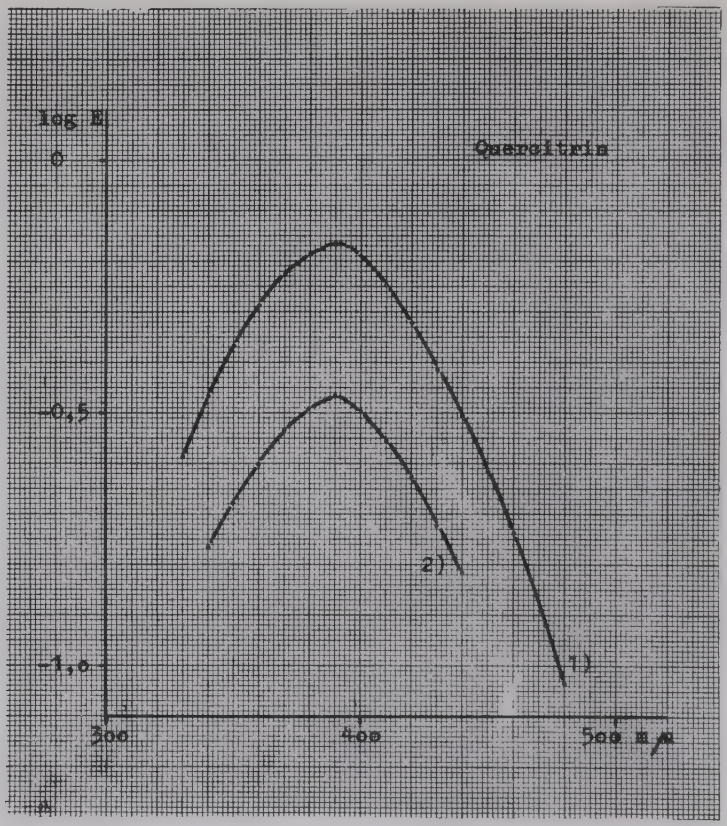
Die gefundenen Extinktionswerte lagen innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches auf einer Geraden und folgten dem Gesetz von LAMBERT-BEER (Tab.8 S.81).

mμ	330	340	350	360	370	375	380
E 1)	0,260	0,341	0,430	0,515	0,595	0,623	0,652
log E 1)	-0,585	-0,467	-0,367	-0,288	-0,226	-0,206	-0,186
E 2)		0,171	0,210	0,250	0,293		0,323
log E 2)		-0,767	-0,678	-0,602	-0,533		-0,491

mμ	385	390	395	400	405	410	420
E 1)	0,669	0,685	0,676	0,648	0,608	0,568	0,479
log E 1)	-0,175	-0,164	-0,170	-0,188	-0,216	-0,246	-0,320
E 2)		0,341		0,320		0,279	0,236
log E 2)		-0,467		-0,495		-0,554	-0,627

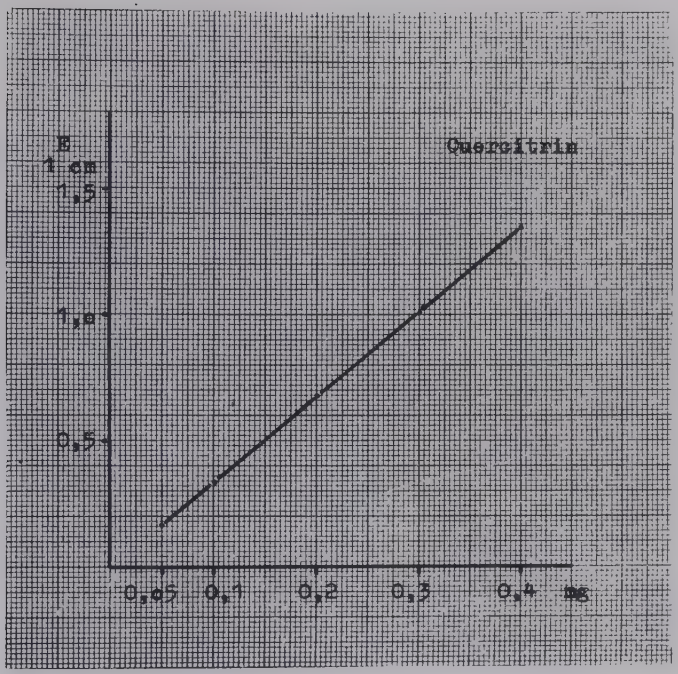
mμ	430	440	450	460	480	500
E 1)	0,387	0,315	0,243	0,185	0,093	0,025
log E 1)	-0,412	-0,502	-0,614	-0,733	-1,032	-1,602
E 2)	0,190	0,153				
log E 2)	-0,721	-0,815				

Tab. 6



Tab. 7

mg	0,o5	0,1	0,2	.0,3	0,4
E	0,17o	0,346	0,68o	1,o1o	1,348



Tab. 8

2.2.1.3. Bestimmung von Quercetin.

Das gereinigte Quercetin (S.74) wurde nach (181) bei 95°-97° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann im Exsikkator aufbewahrt. Es wurde, analog der Rutin-Stammlösung (S.74), eine Quercetin-Stammlösung hergestellt, die in 1 ml 0,1 mg Quercetin enthielt. Diese Lösung war schwach gelblich gefärbt.

Das Aufstellen der typischen Farbkurve erfolgte mit 0,1 mg Quercetin in gleicher Weise und mit demselben Gerät wie bei Rutin (S.75) und Quercitrin (S.78) beschrieben.

Das Absorptionsmaximum lag hier bei 405 mμ (Tab.9 S.83). Eine Eichkurve wurde nicht aufgestellt, da keine grundlegend anderen Ergebnisse erwartet wurden.

2.2.1.4. Vergleich der Ergebnisse mit Reinsubstanzen.

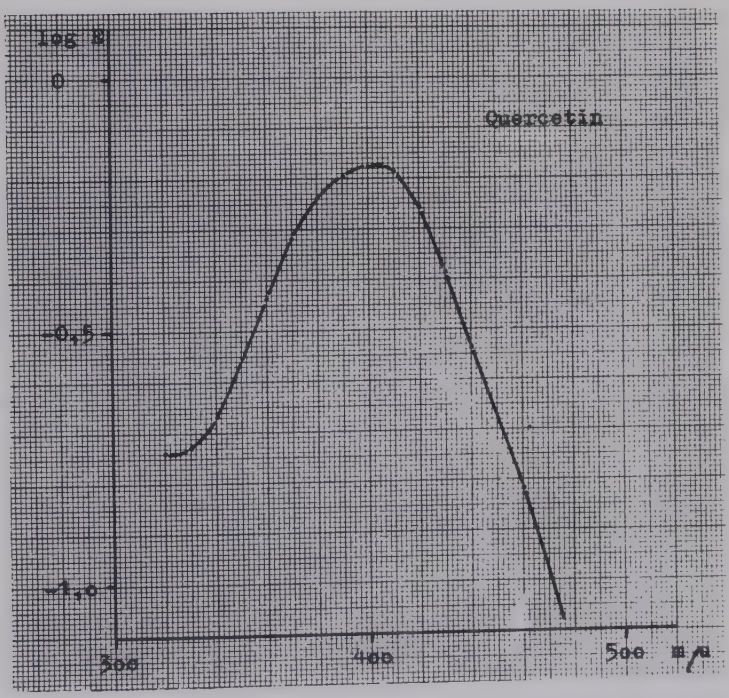
Hinsichtlich der Grösse der Extinktionen im jeweiligen Maximum für jeweils gleiche Mengen Rutin, Quercitrin und Quercetin ist die Extinktion für Quercetin bedeutend grösser als für die anderen beiden Substanzen, deren Werte untereinander nicht so grosse Abweichungen zeigen.

Die Molekulargewichte von Rutin : Quercitrin : Quercetin verhalten sich etwa wie 4:3:2. Die Extinktionswerte für gleiche Konzentrationen sind zwar im Sinne dieses Verhältnisses gegeneinander verschoben, jedoch zahlenmässig nicht soweit diesem Verhältnis entsprechend, dass die Relation der Molekulargewichte allein zur Klärung der Verschiebung ausreichen dürfte.

In der Literatur (35) werden folgende Werte für die Lage der UV-Absorptionsmaxima dieser 3 Verbindungen angegeben : Quercitrin 352 mμ, Rutin 361 mμ und Quercetin 375 mμ. Durch Bildung des Borkomplexes mit Flavognost wird eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in Richtung auf den sichtbaren Bereich des Spektrums um 30 mμ - 38 mμ bewirkt, wodurch Konzentrationsbestimmungen im jeweiligen Maximum des Komplexes auch mit Filterphotometern möglich werden. Die Grösse der Verschiebung des jeweiligen Maximums für die 3 Verbindungen variiert etwas, jedoch bleibt die genannte Reihenfolge Quercitrin - Rutin - Quercetin erhalten.

mμ	320	330	340	350	360	370	380	390
E	0,183	0,187	0,217	0,281	0,369	0,481	0,580	0,640
log E	-0,738	-0,727	-0,664	-0,551	-0,433	-0,318	-0,237	-0,194

mμ	400	405	410	420	430	440	460	500
E	0,667	0,671	0,655	0,553	0,410	0,291	0,153	0,028
log E	-0,176	-0,173	-0,184	-0,257	-0,387	-0,536	-0,815	-1,553



Tab. 9

2.2.2. Untersuchungen mit Extrakten.

2.2.2.1. Untersuchungen mit Blatt-Extrakten.

Untersucht wurden aus dem Handel bezogene Injektionslösungen (Venoplant(R) Amp.), die folgende Deklaration aufwiesen :"Speziell für Injektionszwecke gereinigter Extr. Aesculi e fol. 3,45 %, Aqua bidest. ad 1oo %". Unter "speziell für Injektionszwecke gereinigt" wird hier wohl auch die Entfernung des Saponins verstanden, durchgeführt nach einem Patent der Herstellerfirma (168) (S.54).

Die untersuchten Injektionslösungen wiesen einen feinen Niederschlag auf. Die aufgeschüttelte trübe Suspension hatte eine gelbbraune Farbe. Nach Zugabe von Flavognostlösung konnte wegen der starken Eigenfarbe der Injektionslösung keine eindeutige Farbreaktion beobachtet werden.

Deshalb wurde die Injektionslösung 1:1o mit Methanol verdünnt (=Stammlösung). Es entstand eine klare, hellgelblich gefärbte Lösung, die nach Zugabe von Flavognostlösung eine Farbverstärkung erfuhr und eine kräftige Gelbfärbung annahm.

2.2.2.1.1. Aufstellen der typischen Farbkurve.

1 ml der Injektions-Stammlösung und 1 ml Flavognost-Stammlösung wurden in einen 1o-ml-Messkolben pipettiert, vermischt und mit Methanol auf 1o ml aufgefüllt.

Diese Lösung wurde im BECKMAN-Spektralphotometer Modell-DU bei Verwendung von 1-cm-Küvetten zwischen 32o mμ und 43o mμ durchgemessen. Als Blindlösung diente Methanol.

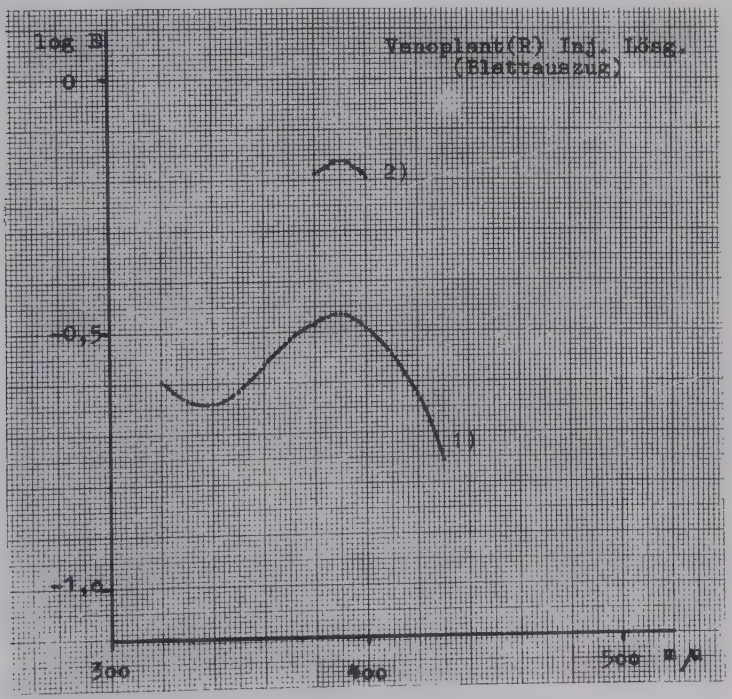
Es ergab sich ein Absorptionsmaximum bei 39o mμ, was durch weitere Messungen mit verschiedenen Farblösungen bestätigt wurde, die ein verschiedenes Alter zwischen 2 und 24 Stunden hatten.

Eine Reaktionslösung mit dem doppelten Gehalt an Injektionslösung ergab die doppelte Extinktion.

Tab.1o (S.85) gibt als E 1) die Extinktionen bei Verwendung von 1 ml Injektions-Stammlösung, als E 2) von 2 ml dieser Lösung wieder.

mμ	320	330	340	350	360	370	380
E 1)	0,254	0,234	0,230	0,242	0,275	0,305	0,330
log E 1)	-0,595	-0,631	-0,638	-0,616	-0,561	-0,516	-0,482
E 2)							0,648
log E 2)							-0,188

mμ	385	390	395	400	410	420	430
E 1)	0,339	0,343	0,334	0,322	0,286	0,236	0,177
log E 1)	-0,470	-0,465	-0,476	-0,492	-0,544	-0,627	-0,752
E 2)	0,673	0,690	0,673	0,638			
log E 2)	-0,172	-0,161	-0,172	-0,195			



Tab. 1o

2.2.2.1.2. Flavonoidgehalt auf Quercitrin berechnet.

Das Absorptionsmaximum des untersuchten Blatt-Extraktes stimmte genau mit dem des Quercitrins (S.78) überein. Das war nicht verwunderlich, denn nach den umfassenden Untersuchungen von HÖRHAMMER (81) wurde Quercitrin als das Haupt-Flavonoid der Blätter von Aesculus Hipp.identifiziert (S.25).

Die weiteren mitextrahierten Blatt-Inhaltsstoffe, kenntlich an der bräunlichen Färbung der Injektionslösung, schienen die beschriebene Reaktion mit Flavognost nicht zu stören. Hierdurch wird die Empfehlung von HÖRHAMMER und Mitarbeitern (98) hinsichtlich der Verwendung von Bor-Verbindungen zum Flavonoidnachweis in Pflanzenauszügen bestätigt.

Wegen der gleichen Lage der Absorptionsmaxima konnten die Blatt-Flavonoide direkt auf Quercitrin bezogen werden.

Beim Vergleich der gefundenen Extinktionen des untersuchten Blatt-Auszuges mit denen der Quercitrinbestimmungen (S.79) ergab sich, dass der auf Quercitrin bezogene Gehalt der verwendeten Injektions-Stammlösung genau dem Gehalt der Quercitrin-Stammlösung entsprach, was einen auf Quercitrin berechneten Gehalt der Original-Injektionslösung von 1 mg pro ml bedeutete.

Dieses einfache Zahlenverhältnis war zunächst verblüffend. Es wurde jedoch bei der Untersuchung einer Injektionslösung gleichen Fabrikates, jedoch mit einer anderen Chargen-Nummer, nicht wiedergefunden, trotz gleicher Versuchsanordnung und gleicher Lage des Absorptionsmaximums. Hier wurde ein auf Quercitrin berechneter Gehalt von 0,65 mg pro ml gefunden. Das entspricht einer Abweichung von 35 %.

Es sollte noch geprüft werden, ob der Zusatz einer bestimmten Menge Quercitrin zu der untersuchten Injektionslösung einen Einfluss auf die Lage des Absorptionsmaximums und die Grösse der Extinktion ausübt. Hierbei wurde gefunden, dass die Lage des Absorptionsmaximums nicht verändert wurde. Es wurde jedoch eine Erhöhung der Extinktion bei 390 mμ gefunden, die genau der Menge des zugesetzten Quercitrins entsprach.

2.2.2.2. Untersuchungen mit Samen-Extrakten.

Es wurden untersucht :

die selbstbereiteten Auszüge A/V/8o, B/V/8o, C/IV/8o, A/V/1oo/S, A/V/1oo/1 (S.4o-41),

aus dem Handel bezogene homöopathische Aesculus-Zubereitungen wie Ø, D1, D2, D3,

sowie aus dem Handel bezogene Venostasin(R) Injektionslösungen und Venostasin(R) Tropfen ohne Vitamin B1+.

Sämtliche vorstehend genannten Auszüge waren blank und besassen eine mehr oder weniger stark ausgeprägte gelbliche Färbung. Nur die Auszüge B/V/8o und C/IV/8o waren infolge der mitextrahierten Samenschale dunkler gefärbt mit einem bräunlichen Farbton.

Alle Auszüge wurden zunächst qualitativ geprüft. Etwa jeweils 1 ml wurde im Reagenzglas mit etwas Flavognost-Stammlösung versetzt. Es entstand jedesmal eine kräftige Gelbfärbung, auch bei den Auszügen B/V/8o und C/IV/8o, bei den homöopathischen Dilutionen D1 - D3 entsprechend weniger stark ausgeprägt.

2.2.2.2.1. Aufstellen der typischen Farbkurven.

Es wurde zunächst untersucht, ob eine vorherige chromatographische Abtrennung der Samenflavonoide erforderlich war. 1 ml der als saponinarm befundenen (S.55,57) obigen Injektionslösung wurde als Strichchromatogramm unter den beschriebenen Bedingungen (S.5o),entwickelt. Die Flavonoide zeigten sich als mehrere gelbe Zonen quer zur Laufrichtung. Nach dem Trocknen des Chromatogramms wurde mit 1o %iger Ammoniaklösung besprüht, wobei die Flavonoid-Zonen stärker hervortraten. Diese Zonen, zwischen den R_F-Werten 0,2 und 0,6 liegend, wurden herausgeschnitten, getrocknet, zerschnitten und im Mikrosoxhlet mit Methanol erschöpfend extrahiert. Dieser Extrakt wurde durch ein kleines gehärtetes Filter gegeben und mit dem gleichen Volumen Flavognost-Stammlösung versetzt. Die vorher kaum gefärbte Lösung nahm dabei eine deutliche

+Der Fa. KLINGE/München sei für die Überlassung herzlich gedankt.

Gelbfärbung an.

Diese Farblösung wurde im BECKMAN-Spektralphotometer Modell-DU bei Verwendung von 1-cm-Küvetten zwischen 32o mμ und 5oo mμ durchgemessen. Als Blindlösung diente Methanol.

Es ergab sich ein Absorptionsmaximum bei 35o mμ (Tab.11 S.89).

Um festzustellen, ob dieser chromatographische Trennungsgang bei Bestimmung des Absorptionsmaximums eingeschaltet werden musste, wurde zunächst aus derselben Injektionslösung durch Verdünnen 1:1o mit Methanol eine Stammlösung hergestellt, von der dann jeweils 2 ml und 5 ml in einen Messkolben pipettiert, mit je 5 ml Flavognost-Stammlösung versetzt und dann mit Methanol auf 1o ml aufgefüllt wurden.

Bei diesen Farblösungen wurde unter den gleichen Bedingungen spektralphotometrisch das Absorptionsmaximum bestimmt. Dabei zeigte sich auch hier ein Absorptionsmaximum bei 35o mμ (Tab.12 S.9o), die chromatographische Abtrennung der Flavonoide hatte also keinen Einfluss auf die Lage des Absorptionsmaximums. Deshalb wurde bei den Untersuchungen der übrigen Auszüge von einer Abtrennung der Flavonoide abgesehen.

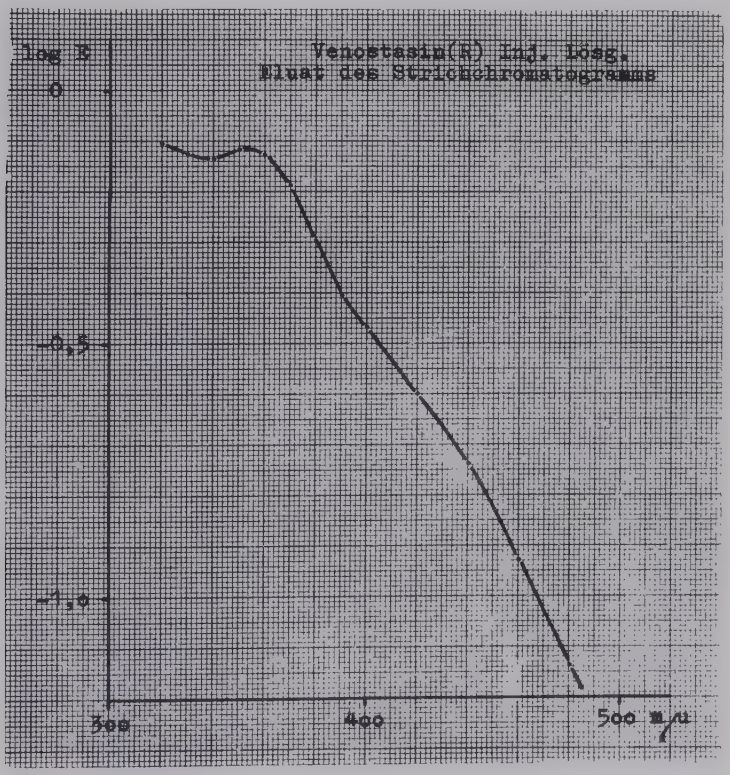
Hinsichtlich der mengenmässigen Beziehungen kann über die chromatographierte Injektionslösung keine Aussage gemacht werden, da durch das Trennungsverfahren Verluste auftraten. Bei der nicht chromatographierten Lösung verhielten sich die Extinktionen bei 35o mμ wie die verwendeten Mengen.

Analog wurden die genannten Auszüge (S.87) zur Messung vorbereitet. Nach dem Verdünnen 1:1o mit Methanol wurden 2,5 ml oder 5 ml in einen Messkolben pipettiert, mit 5 ml Flavognost-Stammlösung versetzt und mit Methanol auf 1o ml aufgefüllt. Gemessen wurde unter den beschriebenen Bedingungen.

Beim Vergleich der Ergebnisse zeigte sich, dass alle untersuchten Samenauszüge unter den Bedingungen des beschriebenen Verfahrens ein Absorptionsmaximum bei 35o mμ ergaben (Tab.11--19 S.89-97). Beimengungen von Samenschale zum Extraktionsgut, kenntlich an der dunkleren, bräunlichen Färbung der Auszüge, hatten keinen Einfluss auf die Lage des Absorptionsmaximums.

mμ	320	330	340	350	360	370	380
E	0,790	0,755	0,739	0,765	0,747	0,650	0,502
log E	-0,102	-0,122	-0,131	-0,116	-0,127	-0,187	-0,299

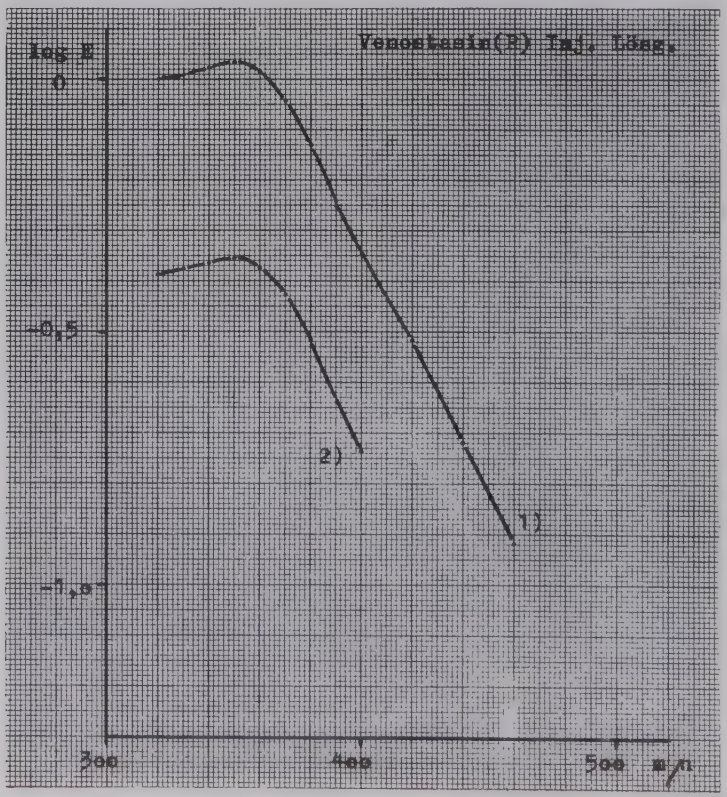
mμ	390	400	420	440	460	480	500
E	0,395	0,341	0,252	0,183	0,118	0,073	0,046
log E	-0,403	-0,467	-0,599	-0,738	-0,928	-1,137	-1,337



Tab. 11

mμ	320	330	340	350	360	370	380
E 1)	1,010	1,028	1,065	1,080	1,030	0,910	0,743
log E 1)	+0,004	+0,012	+0,027	+0,033	+0,013	-0,041	-0,129
E 2)	0,410	0,420	0,434	0,442	0,424	0,376	0,307
log E 2)	-0,387	-0,377	-0,363	-0,355	-0,373	-0,425	-0,513

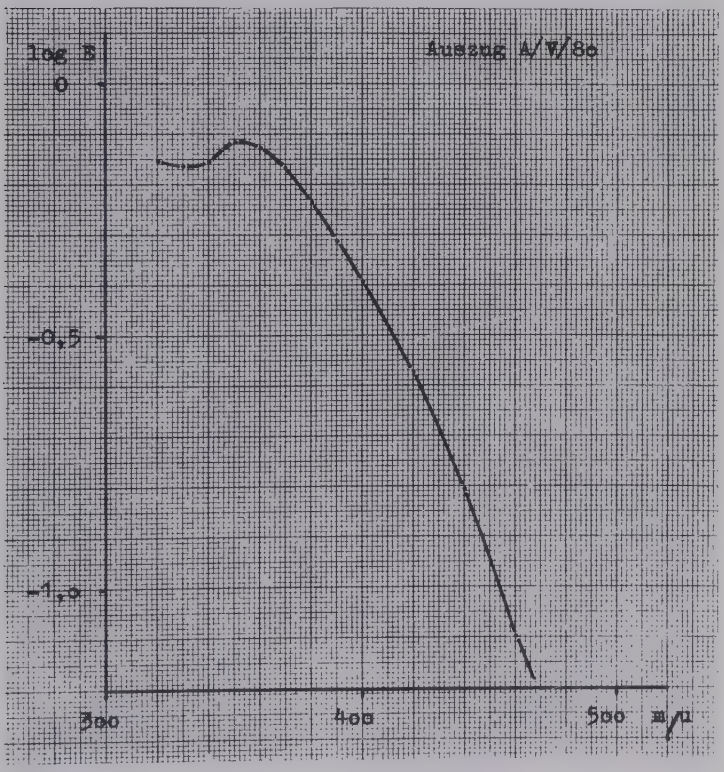
mμ	390	400	410	420	440	460	500
E 1)	0,563	0,452	0,366	0,307	0,191	0,121	0,048
log E 1)	-0,250	-0,345	-0,437	-0,513	-0,719	-0,917	-1,319
E 2)	0,233	0,185					
log E 2)	-0,633	-0,733					



Tab. 12

mμ	320	330	340	350	360	370	380
E	0,700	0,690	0,704	0,762	0,748	0,682	0,582
log E	-0,155	-0,161	-0,152	-0,118	-0,126	-0,166	-0,235

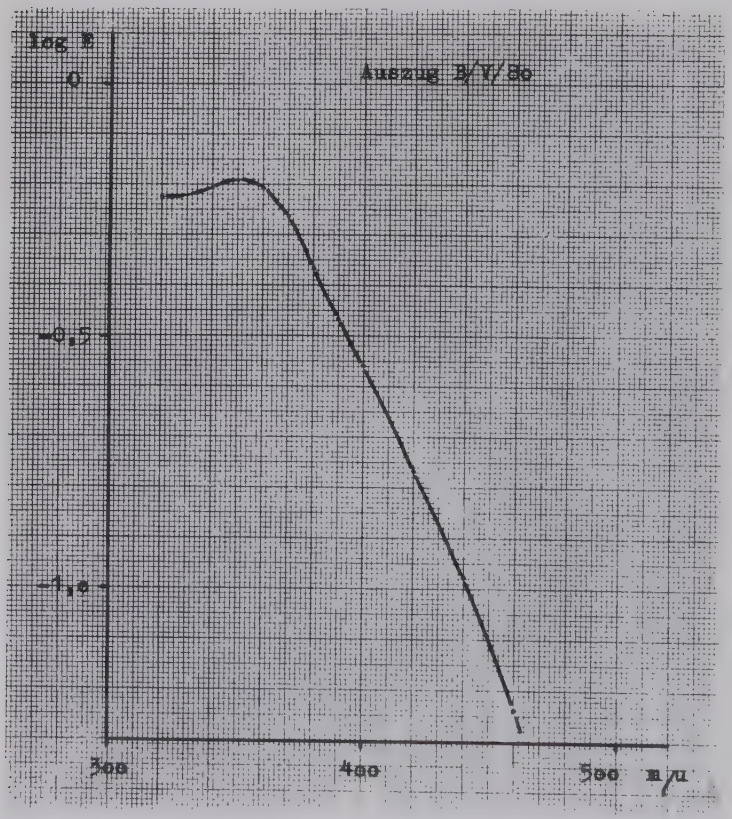
mμ	390	400	420	440	460	480	500
E	0,489	0,406	0,268	0,157	0,080	0,048	0,027
log E	-0,311	-0,392	-0,572	-0,804	-1,097	-1,319	-1,569



Tab. 13

mμ	320	330	340	350	360	370	380
E	0,600	0,602	0,623	0,645	0,625	0,548	0,432
log E	-0,222	-0,220	-0,206	-0,190	-0,204	-0,261	-0,365

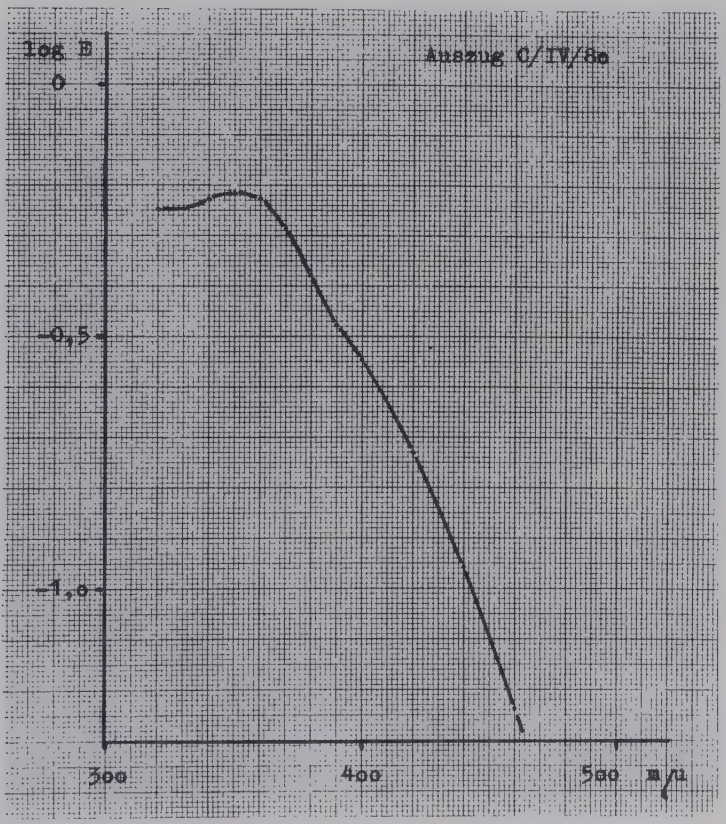
mμ	390	400	420	440	460	480	500
E	0,343	0,276	0,172	0,106	0,058	0,028	0,014
log E	-0,465	-0,559	-0,765	-0,975	-1,237	-1,553	-1,854



Tab. 14

mμ	320	330	340	350	360	370	380
E	0,572	0,572	0,598	0,612	0,595	0,522	0,423
log E	-0,243	-0,243	-0,223	-0,213	-0,226	-0,282	-0,374

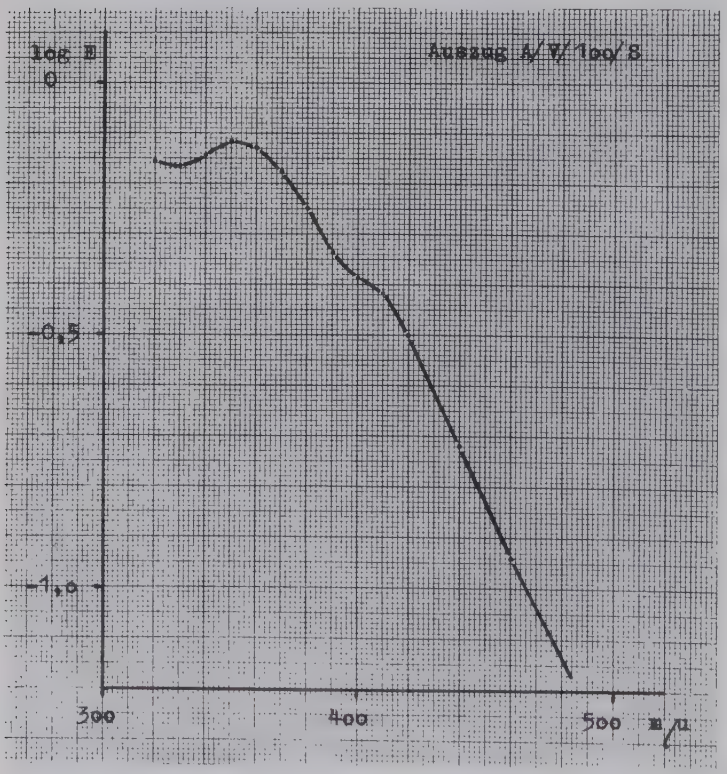
mμ	390	400	420	440	460	480	500
E	0,336	0,287	0,187	0,111	0,058	0,027	0,016
log E	-0,474	-0,542	-0,728	-0,955	-1,237	-1,564	-1,796



Tab. 15

mμ	320	330	340	350	360	370	380
E	0,700	0,683	0,717	0,769	0,748	0,665	0,565
log E	-0,155	-0,166	-0,145	-0,114	-0,126	-0,177	-0,248

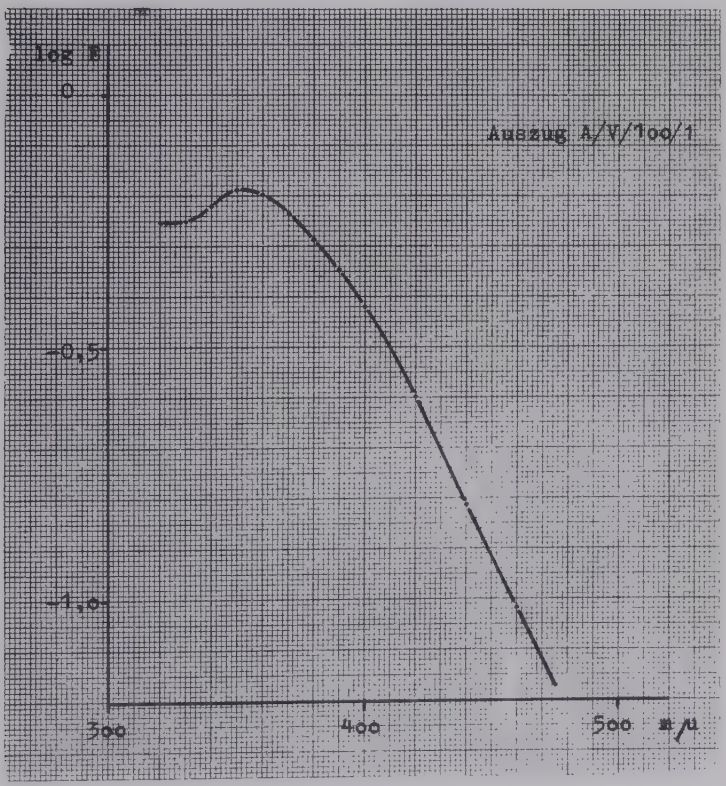
mμ	390	400	410	420	440	460	500
E	0,462	0,411	0,383	0,317	0,192	0,115	0,048
log E	-0,335	-0,386	-0,417	-0,499	-0,717	-0,939	-1,319



Tab. 16

mμ	320	330	340	350	360	370	380
E	0,561	0,563	0,602	0,648	0,632	0,584	0,521
log E	-0,251	-0,250	-0,220	-0,188	-0,199	-0,234	-0,283

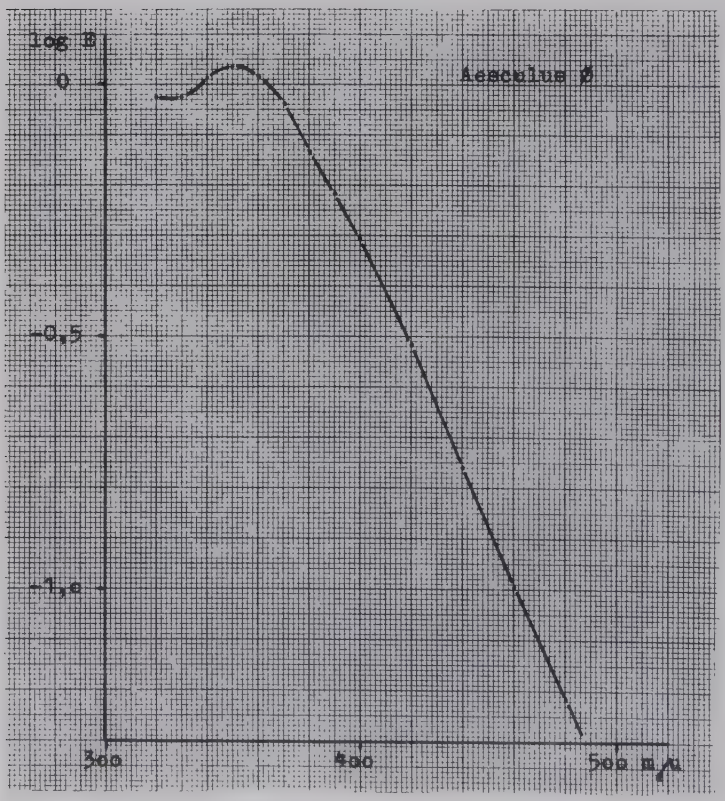
mμ	390	400	420	440	460	480	500
E	0,454	0,382	0,252	0,155	0,097	0,058	0,032
log E	-0,343	-0,418	-0,599	-0,810	-1,013	-1,237	-1,495



Tab. 17

mμ	32o	33o	34o	35o	36o	37o	38o
E	0,941	0,947	1,o28	1,o9o	1,o42	0,918	0,739
log E	-0,o26	-0,o24	+0,o12	+0,o37	+0,o18	-0,o37	-0,131

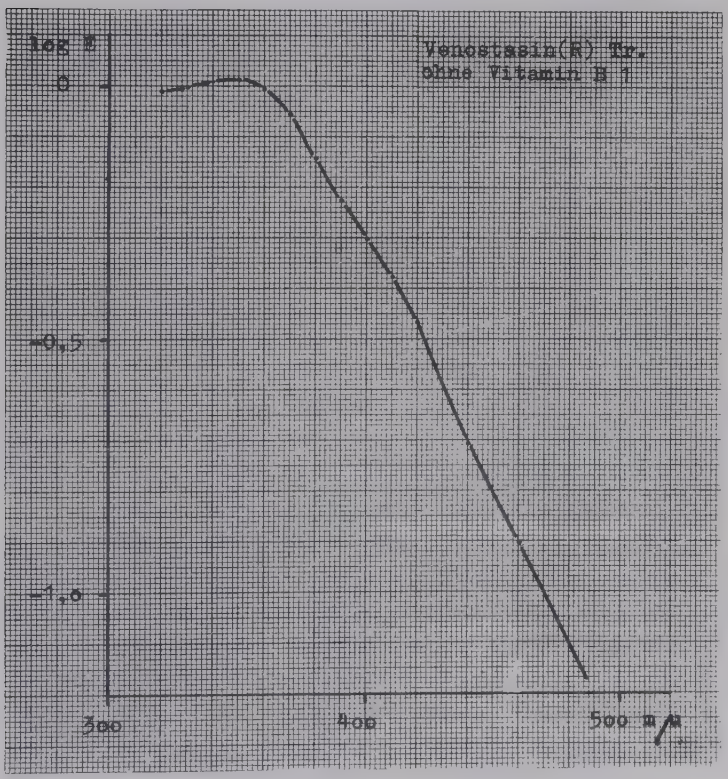
mμ	39o	4oo	42o	44o	46o	48o	5oo
E	0,6o9	0,498	0,3o3	0,174	0,1o1	0,o61	0,o37
log E	-0,215	-0,3o3	-0,519	-0,76o	-0,996	-1,215	-1,432



Tab. 18

mμ	320	330	340	350	360	370	380
E	0,979	0,999	1,022	1,030	0,990	0,888	0,725
log E	-0,009	-0,0004	+0,010	+0,013	-0,004	-0,052	-0,140

mμ	390	400	410	420	440	460	500
E	0,585	0,501	0,421	0,346	0,198	0,126	0,050
log E	-0,233	-0,300	-0,376	-0,461	-0,703	-0,900	-1,301



Tab. 19

2.2.2.2.2.2. Aufstellen der Eichkurven.

Von einer 1:1o mit Methanol verdünnten homöopathischen Urtinktur wurden steigende Volumina von 0,25 ml bis 2,5 ml, entsprechend 0,o25 ml bis 0,25 ml Urtinktur, in je einen Messkolben pipettiert, mit je 5 ml Flavognost-Stammlösung versetzt und dann mit Methanol auf 1o ml aufgefüllt. In gleicher Weise wurde mit dem Extrakt A/V/1oo/S verfahren.

Diese Farblösungen wurden im BECKMAN - Spektralphotometer Modell-DU unter Verwendung von 1-cm-Küvetten und Methanol als Blindlösung bei 35o mμ durchgemessen.

Die gefundenen Extinktionswerte lagen innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches auf einer Geraden und folgten dem Gesetz von LAMBERT-BEER (Tab.2o S.1oo).

Von den übrigen Auszügen wurden keine Eichkurven aufgestellt, da keine grundlegend anderen Ergebnisse erwartet wurden.

2.2.2.2.3. Vergleichende Bestimmungen.

Eine Deckung der gefundenen Absorptionsmaxima bei 35o mμ mit einem der Maxima der untersuchten Reinsubstanzen, wie bei dem untersuchten Blattauszug gefunden, wurde bei den Samenauszügen nicht beobachtet. Deshalb war es nicht möglich, den Flavonoidgehalt der Samenauszüge direkt auf eine der untersuchten Reinsubstanzen zu beziehen. Es konnten also nur relative Vergleiche gezogen werden.

Zu diesem Zweck wurden von den nachstehend aufgeführten Auszügen jeweils 2 ml der methanolischen Verdünnung 1:1o mit je 5 ml Flavognost-Stammlösung versetzt und dann mit Methanol auf 1o ml aufgefüllt. Die Extinktionen dieser Farblösungen wurden unter den beschriebenen Bedingungen bei 35o mμ gemessen.

Auszug je 0,2 ml	A/V/8o	A/V/1oo/1	A/V/1oo/S	Venostasin(R) Inj.Lsg.	Venostasin(R) Tropfen
E	0,62o	0,531	0,629	0,44o	0,413

Auszug je 0,2 ml	Ø I	Ø II	Ø III	Ø IV
E	0,898	0,935	0,92o	0,995

Die Messungen ergaben für die homöopathischen Urtinkturen die höchsten Extinktionswerte, also den grössten Flavonoidgehalt. Urtinkturen verschiedener Herkunft ergaben untereinander eine Abweichung von nur ± 5 %.

Die Werte für die übrigen Auszüge lagen bedeutend niedriger und zeigten auch untereinander grössere Schwankungen.

Unter den gleichen Bedingungen wurden einige homöopathische Dilutionen durchgemessen. Ein vorheriges Verdünnen der Dilutionen unterblieb jedoch. Bei D3 wurde 1 mg Flavognost in 1o ml der Dilution unter häufigem Schütteln gelöst. D4 war unter diesen Bedingungen nicht mehr messbar.

Auch hier ergaben die Werte teilweise grössere Abweichungen untereinander.

Dilution	D1 je 1 ml	D2 je 2 ml	D3 je 1o ml
E 1)	1,29o	0,245	0,125
E 2)	1,26o	0,347	0,o88
E 3)		0,191	0,o75
E 4)		0,341	

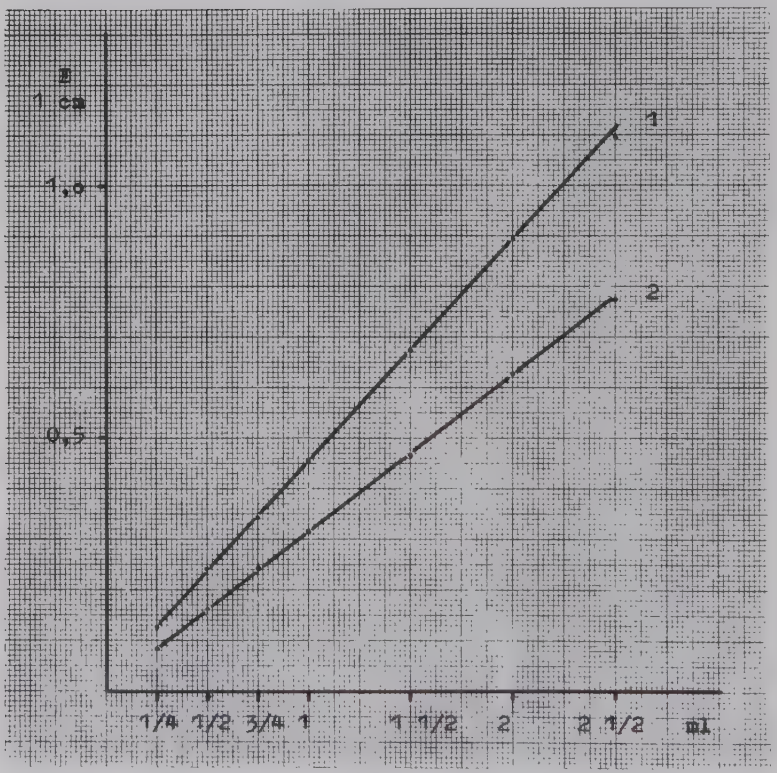
2.2.2.3. Untersuchungen mit einer Mischung von Blatt- und Samen-Extrakten.

Je 1 ml der Stammlösung des Blatt-Extraktes (S.84) und der Venostasin(R) Injektionslösung (=Samen-Extrakt)(S.88) wurden in einen Messkolben pipettiert, vermischt, mit 5 ml Flavognost-Stammlösung versetzt und die Mischung mit Methanol auf 1o ml aufgefüllt. Unter den beschriebenen Bedingungen wurde das Absorptionsmaximum festgestellt.

Dieses lag hier bei 37o mμ (Tab.21 S.1o1), also genau in der Mitte zwischen den Maxima der beiden unvermischten Extrakte.

ml	0,o25	0,o5	0,o75	0,1	0,15	0,2	0,25
E 1)	0,123	0,241	0,346	0,459	0,675	0,898	1,o97
E 2)	0,o82	0,162	0,245	0,315	0,468	0,629	0,774

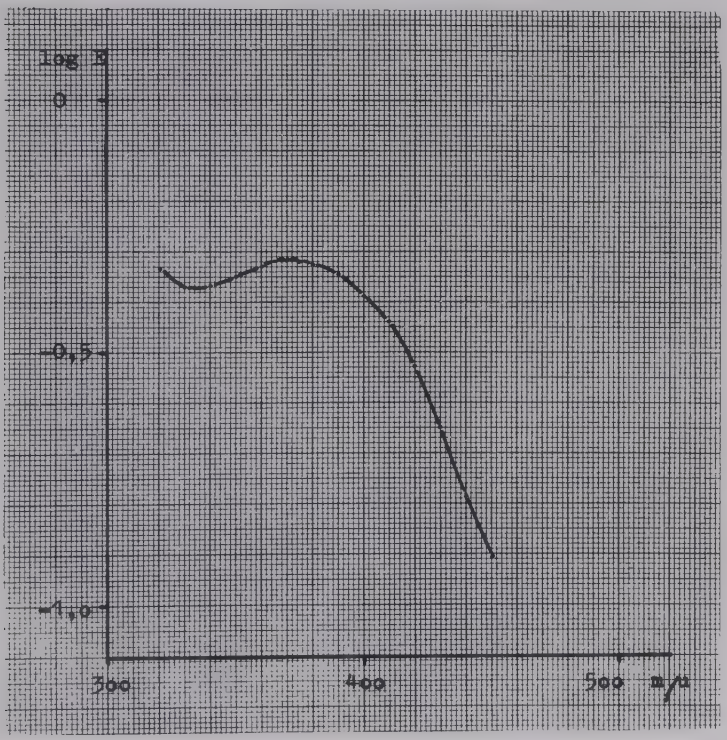
1) = Aesculus Ø
2) = Auszug A/V/1oo/S



Tab. 2o

mμ	320	330	340	350	360	365	370	375
E	0,467	0,428	0,430	0,448	0,469	0,479	0,485	0,480
log E	-0,331	-0,369	-0,367	-0,349	-0,329	-0,320	-0,314	-0,319

mμ	380	390	400	410	420	430	440	450
E	0,477	0,450	0,418	0,365	0,296	0,225	0,165	0,125
log E	-0,322	-0,347	-0,379	-0,438	-0,529	-0,648	-0,783	-0,903



Tab. 21

2.2.3. Papierchromatographie.

Es wurden die bereits beschriebenen Bedingungen (S.5o) eingehalten. Besprüht wurde mit Flavognost-Stammlösung (S.73).

2.2.3.1. Untersuchung von Reinsubstanzen.

Die verwendeten Reinsubstanzen Rutin, Quercitrin und Quercetin waren bereits papierchromatographisch auf Reinheit geprüft (S.74) und zum Teil umkristallisiert worden. Jedoch wurden bei diesen Reinheitsprüfungen veränderte Bedingungen eingehalten, sodass sich andere als die folgenden R_F-Werte ergaben.

Unter den Bedingungen (S.5o) wurden als R_F-Werte für Rutin 0,54, für Quercitrin 0,77 und für Quercetin 0,67 festgestellt, wobei es sich um Durchschnittswerte mehrerer Bestimmungen handelt.

Rutin und Quercitrin erschienen unter der UV-Lampe auf dem Chromatogramm als graue Flecke, Quercetin als gelber Fleck. Durch das Besprühen mit Flavognostlösung traten Farbverstärkungen und teilweise Farbänderungen auf. Letztere waren jedoch nur bei UV-Licht erkennbar. Rutin und Quercitrin erschienen jetzt als orangefarbene Flecke, der Quercetinfleck blieb gelb.

Als Nachweisgrenzen für die 3 Substanzen wurden im Tüpfeltest 0,o1 µg festgestellt. Dabei waren die Flecke bei Tages- und UV-Licht ohne Besprühen nicht sichtbar. Erst nach dem Besprühen traten die beschriebenen Farben hervor, jedoch nur bei UV-Licht. Bei Tageslicht waren erst 0,1 µg nach dem Besprühen als leicht gelbliche Flecke erkennbar.

Auf dem Papierchromatogramm lag die Nachweisgrenze nach dem Besprühen und Betrachten unter der UV-Lampe bei 0,1 µg.

2.2.3.2. Untersuchung von Blattauszügen.

Es wurde die bereits beschriebene Injektionslösung (S.84) untersucht. Bei Auftragen von 1 µl zeigte sich nach dem Entwickeln und Besprühen nur e i n Fleck mit dem R_F-Wert 0,77,

identisch mit Quercitrin. Erst nach Auftragen von 5 µl zeigten sich noch weitere Farbflecke mit anderen R_F-Werten.

Die in der Literatur (81) beschriebene Feststellung, dass Quercitrin das Hauptflavonoid der Blätter sei, wurde auf diese Weise demonstriert.

2.2.3.2. Untersuchungen von Samen-Auszügen.

Es wurden 3 Hauptflavonoide mit den R_F-Werten 0,38, 0,44 und 0,53 sowie 2 Nebenflavonoide mit je einem höheren und einem niederen R_F-Wert festgestellt. Der Nachweis wurde durchgeführt nach Auftragen von jeweils 1o µl des betreffenden Auszuges durch Besprühen mit Flavognostlösung und Betrachten unter der UV-Lampe. Tageslicht war nicht ausreichend. Versuche zur Identifizierung wurden nicht angestellt, da es für diese Arbeit nicht wesentlich schien und von berufener Seite bereits an der Aufklärung der Samenflavonoide gearbeitet wird (32).

Bei homöopathischen Zubereitungen gelang der Nachweis der Hauptflavonoide bis D2. Alle 5 Flavonoide waren nur bei der Urtinktur nachweisbar, während bei D1 4 Flavonoide zu erkennen waren (Abb.9 S.1o4). Die Farbbezeichnungen beziehen sich auf die Farbtönungen bei UV-Licht.

Abb.1o (S.1o5) zeigt das Chromatogramm der Reinsubstanzen und einiger Auszüge. Die Farbflecke wurden bei UV-Licht eingezeichnet. Von den Reinsubstanzen wurden je 1 µg aufgetragen, von den Auszügen je 1o µl. Die Farbtönungen bei UV-Licht wurden abgekürzt : O=orange, g=gelb, gr=grün, l= hell leuchtend.

1 = Venostasin(R) Tropfen
2 = " Inj.Lsg.
3 = Venoplant(R) Tropfen
4 = Rutin (R_F 0,54), Quercetin (R_F 0,67), Quercitrin (R_F 0,77)
5 = Aesculus Ø HAB
6 = Auszug A/V/1oo/1
7 = " A/V/1oo/S
8 = " C/IV/8o

Bei diesen Auszügen waren alle 5 Flavonoide zu erkennen. Eine chromatographische Gleichheit mit den Reinsubstanzen fand sich jedoch nicht. Der Auszug 3) fällt aus dem Rahmen, da auf Grund der Deklaration auch Auszüge anderer Pflanzen enthalten sind.

Abb.11 (S.1o6) zeigt dasselbe Chromatogramm, photographiert bei UV-Licht vor Einzeichnung der Farbflecke. Wegen dieser Beleuchtung wurde die Aufnahme zwangsläufig etwas unscharf, jedoch sind die Farbflecke der Hauptflavonoide gut zu erkennen.

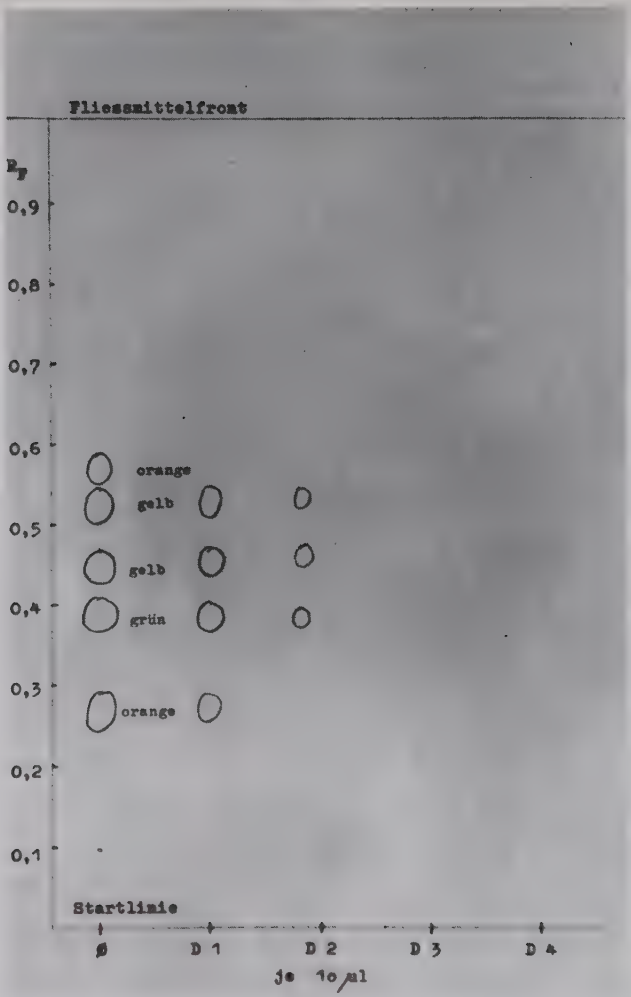

Fliessmittelfront
R_f
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
orange
gelb
gelb
grün
orange
Startlinie
ø
D 1
D 2
D 3
D 4
je 10 µl

Abb. 9

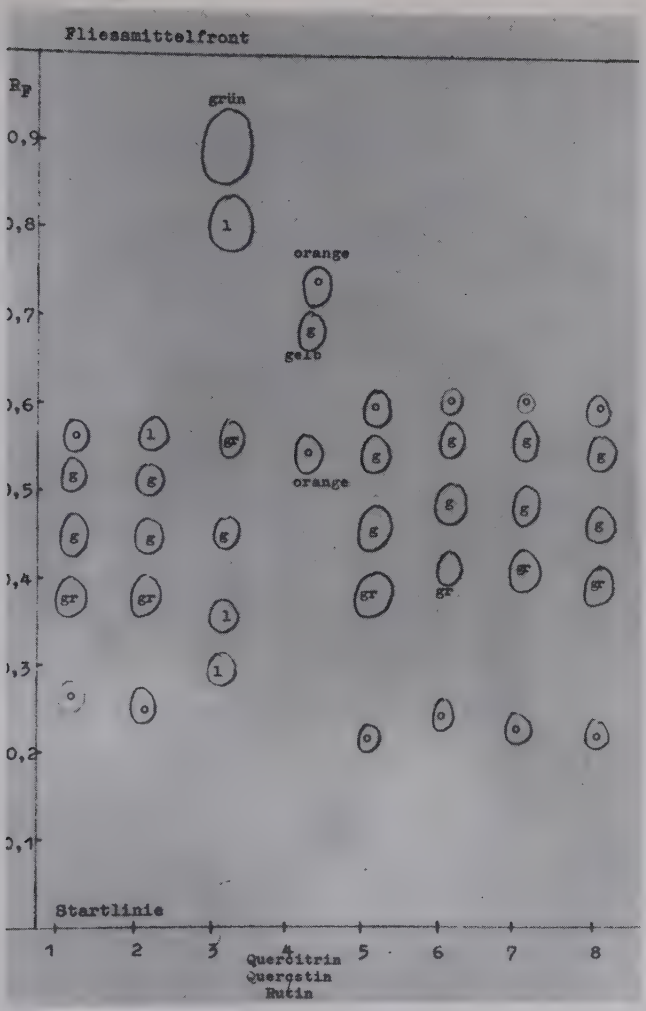

Fliessmittelfront
Rf
0,9
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
grün
l
orange
o
g
gelb
orange
gr
Startlinie
1
2
3
4
5
6
7
8
Queroitrin
Quercetin
Rutin

Abb. 10

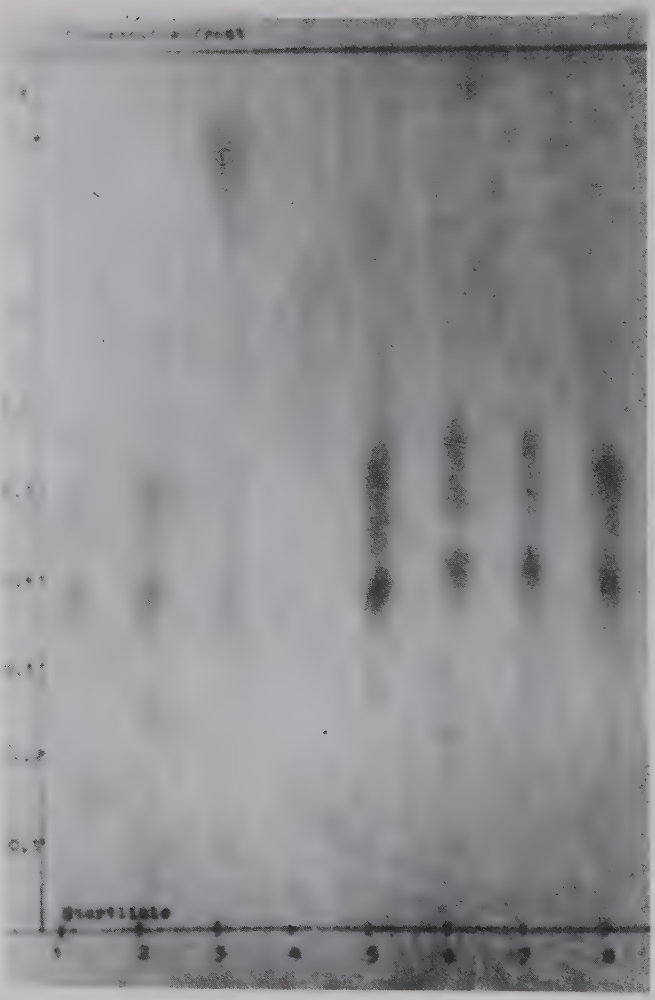


Abb. 11

3. Diskussion.

Zur Gewinnung des Aescin hat sich allein das Verfahren von MERKEL (54) als geeignet erwiesen, das gestattete, reines kristallisiertes Aescin mit definiertem Schmelzpunkt zu gewinnen. Die Eigenschaften des gewonnenen Aescin, insbesondere der Schmelzpunkt von 222°, deckten sich mit den Angaben von MERKEL. Hinzu kommt die praktische Übereinstimmung der hämolytischen Indizes von 288.000 beziehungweise 285.000, was überraschend ist, da gerade bei biologischen Wertbestimmungen mit grösseren Fehlern zu rechnen ist. So kann dieses als Beweis für die Identität der Präparate gelten.

Ein Vergleich der IR-Spektren, die man als weiteren Beweis für die Identität hätte heranziehen können, war leider nicht möglich, da das Vergleichspräparat nicht zur Verfügung stand und ein IR-Spektrum für Aescin bisher in der Literatur nicht bekannt geworden ist. Das nun vorliegende IR-Spektrum lässt alle charakteristischen Gruppen des Aescin zum Ausdruck kommen. Ein Vergleich mit dem IR-Spektrum der Tiglinsäure ergibt, dass diese, obwohl als Spaltprodukt des Aescin erhalten, als Bestandteil des Aescinmoleküls ausgeschlossen werden kann. Die Tiglinsäure kann also nur sekündär während der Spaltung des Aescin zu Aescinol entstanden sein.

Hinsichtlich einer Gehaltsbestimmung im Sinne einer physikalisch-chemischen Wertbestimmung hat sich nach eingehenden Untersuchungen der Droge nur eine Bestimmung der Reinsubstanz, also des reinen Aescin, als geeignet erwiesen, da Begleitstoffe, wie sie naturgemäss in galenischen Zubereitungen vorhanden sind, die Bestimmung stören. Eine quantitative Abtrennung, die zur Grundlage einer Bestimmung des Aescin in galenischen Präparaten hätte dienen können, gelang nicht.

Papierchromatographische Untersuchungen haben ergeben, dass Aescin und natives Aesculus-Saponin unter den Bedingungen des angegebenen Verfahrens unterschieden werden können. Dabei ergab Aescin höhere R_F-Werte als das native Saponin.

Eine unterschiedliche hämolytische Aktivität dieser beiden Stoffe war bereits bekannt. Eine hämolytische Wertbestimmung erscheint deshalb nur sinnvoll, wenn Aescin oder natives Saponin getrennt vorliegen und nicht beide Stoffe gleichzeitig. Die Klärung dieser Frage kann jetzt papierchromatographisch gelöst werden. Trotzdem bleibt eine hämolytische Wertbestimmung des Saponins in Aesculus-Auszügen problematisch.

Für die Durchführung eines einfachen qualitativen Nachweises des Saponins hat sich die Papierchromatographie als besonders geeignet erwiesen, wobei das Chromatogramm mit einer Blutaufschwemmung besprüht wird. Die Ausbildung eines hämolytischen Hofes zeigte sich schon nach wenigen Minuten. Dieses Verfahren wird für die Aufnahme in ein neues HAB als besonders geeignet gehalten.

Es ist in der Literatur verschiedentlich geäussert worden, dass das Saponin nicht an der Wirkung von Injektionslösungen aus Aesculus-Auszügen beteiligt sein kann, da es wegen der hämolytischen Wirksamkeit vorher entfernt sein muss. Es hat sich jedoch gezeigt, dass ein Handelspräparat zu Injektionszwecken, hergestellt aus den Samen von Aesculus Hippocastanum, noch deutlich nachweisbare Mengen Saponin enthält, was papierchromatographisch nachgewiesen wurde. Das besagt einerseits, dass das Cholesterinbindungsvermögen nicht ausreicht, um das Saponin vollständig zu entfernen. Andererseits kann das Saponin als Wirkstoff von Injektionslösungen nicht ausgeschlossen werden, da es hierin eindeutig nachgewiesen wurde.

Während beim Saponin eine quantitative photometrische Bestimmung nur bei der vorher isolierten Reinsubstanz gelang, wurde für die Flavonoide ein einfaches Verfahren gefunden, das, sofern die geeignete Bezugssubstanz vorlag, die Bestimmung in ungereinigten Extrakten gestattete. Die Brauchbarkeit des Verfahrens wurde zunächst mit den Reinsubstanzen Rutin, Quercitrin und Quercetin geprüft.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass Blatt-Extrakte hinsichtlich des Flavonoidgehaltes direkt auf Quercitrin be-

zogen werden können. Verschiedene Chargen eines Handelspräparates wiesen dabei einen verschiedenen Gehalt auf. Eine Einstellung hinsichtlich des Wirkstoffgehaltes erscheint deshalb unerlässlich.

Im Gegensatz zu der Untersuchung von Blatt-Extrakten haben sich die Bezugssubstanzen Rutin, Quercitrin und Quercetin für die Bestimmung der Samen-Extrakte als nicht geeignet erwiesen. Ohne genaue Kenntnis der Samenflavonoide lässt sich eine photometrische Bestimmungsmethode noch nicht festlegen.

Da alle untersuchten Samen-Extrakte unter den Bedingungen der beschriebenen Reaktion ein Absorptionsmaximum bei der gleichen Wellenlänge besassen, liessen sich jedoch zwischen den einzelnen Auszügen Vergleiche hinsichtlich des Flavonoidgehaltes ziehen. Eine vorherige chromatographische Abtrennung der Flavonoide erwies sich als nicht erforderlich.

Es hat sich ergeben, dass für praktische Zwecke ein Standardauszug als Bezugslösung geeignet erscheint, wobei als Forderung zu erheben ist, dass der Flavonoidgehalt des Standardauszuges nicht unterschritten werden darf.

Ein beliebiges Flavonoid als Bezugssubstanz zu wählen, von dem nicht bekannt ist, ob dessen Eigenschaften hinsichtlich der Lichtabsorption nach Durchführung einer Farbreaktion mit der von Aesculus-Extrakten übereinstimmt, scheint abwegig zu sein. Ohne Aufstellung von "typischen Farbkurven" sind diese Eigenschaften nicht miteinander vergleichbar. Diese Untersuchungen fehlen in einer Arbeit von RÖMISCH (175), die nach Abschluss der eigenen Untersuchungen veröffentlicht wurde. Im Prinzip jedoch wurde die eigene Konzeption bestätigt, dass es möglich ist, den Flavonoidgehalt in ungereinigten Aesculus-Extrakten durch Extinktionsmessungen bathochromer Flavonoidkomplexe zu bestimmen. Nur als "Schnellmethode" dürfte das eigene Verfahren wegen seiner Einfachheit besser geeignet sein.

4. Zusammenfassung.

Die vorliegende Arbeit behandelt zunächst die pharmazeutische Verwendung der Rosskastanien (Semen Aesculi Hippocastani) gemäss der verschiedenen Pharmakopoeen.

Dann wird ein Überblick über die verschiedenen Inhaltsstoffe gegeben, wobei die Wirkstoffe besonders herausgestellt werden und die sich in dieser Hinsicht teilweise widersprechende Literatur kritisch gesichtet wird.

Als Wirkstoffe der Aesculus-Samen werden heute nur zwei Gruppen der Inhaltsstoffe anerkannt, das Saponin und die Flavonoide. Die Wirkung der Aminopurine ist umstritten. Die Kumarine scheiden aus, weil sie keine Bestandteile der Samen sind.

Die Chemie, das Vorkommen, Gewinnungsmethoden und Nachweise des Saponins und der Flavonoide werden zum Teil eingehend besprochen, wobei die Literatur bis Anfang 1960 berücksichtigt wird.

In Hinblick auf die Wirkung des Aesculus-Saponins und der Flavonoide sowie der Aesculus-Auszüge wird ein Überblick über die pharmakologische und klinische Literatur gegeben. Das Gleiche gilt für die Anwendung von Aesculus-Auszügen.

Im experimentellen Teil der Arbeit wird die Gewinnung von Aescin und einiger seiner Abbauprodukte aus den vorher entsprechend vorbehandelten und extrahierten Aesculus-Samen beschrieben. Für reines Aescin wurde eine Farbreaktion gefunden, die auch eine quantitative photometrische Bestimmung gestattete.

Papierchromatographisch wurde ein unterschiedliches Verhalten von Aescin und nativem Saponin festgestellt. In Injektionslösungen, die ex definitione wegen der Hämolysewirkung saponinfrei sein sollen, wurde papierchromatographisch eindeutig Saponin nachgewiesen. Das Saponin kann also als Wirkstoff nicht ausgeschlossen werden, was teilweise in der

Literatur geschieht.

Erstmalig wurde ein IR-Spektrum von Aescin aufgenommen, das alle charakteristischen Gruppen des Moleküls erkennen lässt.

Für die Flavonoide wird eine Farbreaktion beschrieben, deren Eignung für quantitative photometrische Bestimmungen zunächst mit den Reinsubstanzen Rutin, Quercitrin und Quercetin geprüft wurde. Diese Reaktion konnte auch mit ungereinigten Aesculus-Extrakten durchgeführt werden. Bei der beschriebenen quantitativen photometrischen Bestimmungsmethode konnte der Flavonoidgehalt von Blatt-Extrakten direkt auf Quercitrin bezogen werden. Bei Samen-Extrakten fehlt eine entsprechende Bezugssubstanz, jedoch konnten hinsichtlich des Flavonoidgehaltes relative Vergleiche gezogen werden, da sämtliche untersuchten Samen-Extrakte unter den Bedingungen der beschriebenen Methode ein Absorptionsmaximum bei der gleichen Wellenlänge besassen.

5. Literaturverzeichnis.

1. MADAUS,H.: Lehrbuch d. biolog. Heilmittel, Abt.I Heilpflanzen, Leipzig 1938, S. 418

2. GRÄSER,F.: Dtsch. Apotheker 6, 67 (1954)

3. MORELOT,S.: Nouveau dictionaire general des drogues simples et composees, Paris 18o7, S. 16

4. DEQUEKER,R.: Pharmakognostische Commentaar op de Belgische Pharmacopee IV, Leuven 1949, S. 36

5. KARSTEN,G. u. WEBER,U.: Lehrbuch d. Pharmakognosie, Jena 1949, S. 288

6. HOMÖOPATHISCHES ARZNEIBUCH (HAB), 2. Ausg., Berlin 1949, S. 49

7. SCHINDLER,H.: Arzneim. Forsch. 1, 186 (1951)

8. HPUS zit. nach HAGERS HANDBUCH, E II, Berlin 1958, S. 434

9. SCHINDLER,H.: Vorschläge f.d. neue Deutsche Homöopathische Arzneibuch, Verlag d. Württemberg. Apothekerschaft, Heft 1 (1955), S. 15 u. 3o

1o. " : dto. Heft 2 (1956), S. 65-68

11. " : dto. Heft 3 (1957), S. 114

12. " : dto. Heft 4 (1958), S. 158

13. PHARMACOPOEA HELVETICA V, Suppl. II, Bern 1955, S. 167 u. 136

14. PHARMACOPOEA GALLICA (CF), Paris 1949, S. 472, 32, 31o u. 894

15. zit. nach HAGERS HANDBUCH, E I, Berlin 1949, S. 149

16. zit. nach SUBSIDIA PHARMACEUTICA, Zürich 1959, Kommentar PM, S. 17

17. zit. nach HAGERS HANDBUCH, Berlin 1949, Bd. I, S. 28o

18. PRAESCRIPTIONES MAGISTRALES, Zürich 1956, S. 27

19. PEYER,W.: Dtsch. Apoth. Ztg. 83, 339 (1943)

2o. v. CZETSCH-LINDENWALD,H.: Pflanzl. Arzneizubereitungen, Stuttgart 1945,S.94

21. HELWIG,B.: Moderne Arzneimittel, Stuttgart 1956, S. 491-492 u. 132

22. DIECKMANN : Pharmazie 1, 27o (1946)

23. KELLNER zit. nach DIECKMANN (22)

24. KRÜGER,M.: Dtsch. Heilpfl. 9, 82 (1943)

25. ALEXA,V. u. Mitarb.: Acad. rep. populare Romane 3, 1o9 (1952) ref. C.A. 5o, 11 562 (1956)

26. KAUFMANN,H.P. u. BALTES,J.: Fette u. Seifen 45, 175 (1938)

27. SCHINDLER,H.: Inhalsstoffe u. Prüfungsmethoden homöopathisch verwendeter Heilpflanzen, Aulendorf 1955, S. 2o4

28. WINDAUS,A. u. BOCK,F.: Ztschr. physiolog. Chemie, 25o, 258 (1937)

29. DAM,H.: Ztschr. f. Vitaminforsch. 8, 248 (1938).

3o. SCHEUNERT,A. u. THEILE,E.: Pharmazie 7, 776 (1952)

31. HAENEL,H.: Pharmazie 9, 489 (1954)

32. KRANEN-FIEDLER,U.: Aus unserer Arbeit, Jubiläumsschrift Dr. W. Schwabe, Karlsruhe 1956, S. 64 ff.

33. KURSANOW,A.L.: Pharmazie, Beilage Heft 1 (1954)

34. FIEDLER,U. u. HILDEBRAND,G.: Arzneim. Forsch. 4, 426 (1954)

35. PAECH,K. u. TRACEY,A.V.: Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Berlin 1955, Bd. III, S. 58 ff. u. 487

36. TSCHESCHE,R. u. HEESCH,A.: Chem. Ber. 85, 1o67 (1952)

37. HEINE,E.W.: Pharmazie 8, 467 (1953)

38. KARRER,P.: Lehrb. d. org. Chemie, Leipzig 1943, S. 76o u. 578

39. RUZICKA,L. u. VAN VEEN,A.G.: Ztschr. physiol. Chem. 184, 69 (1929)

4o. WINTERSTEIN,A.: Ztschr. physiol. Chem. 199, 25 (1931)

41. KLEIN,G.: Handbuch d. Pflanzenanalyse, Wien 1932, Bd. 3/II, S. 1124 u. 11o6

42. KOBERT,R.: HEFTER's Handb. d. experiment. Pharmakol. (1924), S. 1477 ff.

43. HUNNIUS,C.: Pharmazeutisches Wörterbuch, Berlin 1955, S. 16

44. MASSON,G.: Bull. Siences Pharmakol. 25, 65 (1918), zit. nach (41)

45. MARTENS,H.: Neuere Erkenntnisse zur Pharmakologie der Saponine, Diss. Hamburg 1958

46. VAN DER HAAR,A.W.: Rec. trav. chim. Pays-Bas 42, 1o8o (1923), zit.n.(41)

47. " " " ; " " " " " 42, 67 (1923), zit. n. (5o)

48. ROCHLEDER,F.: J. prakt. Chem. 1o1, 415 (1867), zit. nach (49)

49. RUZICKA,L., JANETT,W. u. REY,E.: Helv. chim. Acta 25, 1665 (1949)

5o. RÖMISCH,H.: Planta medica 4, 184 (1956)

51. RUZICKA,L., BAUMGARTNER,W. u. PRELOG,V.: Helv.chim.Acta 32, 2057 (1949)

52. " " " : " " " 32, 2069 (1949)

53. CAINELLI,G., MELERA,A., ARIGONI,D. u. JEGER,O.: Helv. chim. Acta 40, 2390 (1957)

54. MERKEL,J.: Deutsches Wirtschaftspatent (DDR) 11 178 (1953)

55. FIEDLER,U.: Arzneim. Forsch. 4, 213 (1954)

56. JERMSTAD,A. u. WAALER,T.: Pharm. Acta Helv. 28, 265 (1953)

57. RÖMISCH,H.: Pharmazie 11, 475 (1956)

58. MERKEL,J.: Deutsches Wirtschaftspatent (DDR) 11 942 (1954)

59. RÖMISCH,H.: Pharmazie 13, 707 (1958)

60. BRIESKORN,C.H. u. HERRIG,H.: Fette-Seifen-Anstrichm. 61, 1077 (1959)

61. CORCILIUS,F.: Planta medica 3, 55 (1955)

62. AWE,W. u. HÄUSSERMANN,H.: Arch. Pharm. 283, 7 (1950)

63. DRP 144 760, zit. nach LANGE,O.: Chem. techn. Vorschr., Leipzig 1920

64. BOEDECKER,F.: DBP 806 549 (1951)

65. " : DBP 816 704 (1951)

66. " : DBP 916 664 (1954)

67. MERKEL,J.: Deutsches Wirtschaftspatent (DDR) 11 861 (1953)

68. GSTIRNER,F.: Prüfg. u. Verarbeitg. v. Arzneidrogen, Berlin 1955, Bd. I, S. 46 ff.

69. KOFLER,L.: Die Saponine, Wien 1927

70. MAZUREK,I.: Pharmazie 9, 310 (1954)

71. BUTZ,W.: Pharm. Acta Helv. 20, 295 (1945)

72. FINHOLT,P.: Arch. Pharm. Chem. 114, 1026 (1957)

73. SCHEIDEGGER,W.: Diss. Bern 1947, zit. nach (70)

74. KARMA,H. u. v. SCHANTZ,M.: Scientia Pharm. 27, 6 (1959)

75. REITSTÖTTER,J. u. SCHIPKE,F.: Arch. Pharm. 284, 101 (1951)

76. AWE,W. u. HÄUSSERMANN,H.: Arch. Pharm. 284, 106 (1951)

77. APT,F.: Ber. d. Dtsch. Pharm. Ges. 31, 155 (1921), zit. nach (70)

78. JERMSTAD,A. u. WAALER,T.: Pharm. Acta Helv. 28, 225 (1953)

79. SCHULTZ,O.E. u. BARTHOLD,E.: Pharmazie 4, 521 (1949)

8o. ROCHLEDER,F.: S.-Ber. Wiener Acad. Math.-Phys. Cl. 33, 365 (1858), zit. nach (81)

81. HÖRHAMMER,L. u. Mitarb.: Arch. Pharm. 292, 113 (1959)

82. GESSNER,O.: Die Gift- u. Arzneipflanzen v. Mitteleuropa, Heidelberg 1953, S. 253

83. PARIS,R.: Ann. pharm. franc. 9, 124 (1951)

84. GEHRMANN,H.J. u. Mitarb.: Naturw. 42, 181 (1955)

85. LANGENBECK,W.: Lehrbuch d. org. Chemie, Dresden 1948, S. 437

86. FIESER,L.F. u. FIESER,M.: Lehrb.d.org.Chem., Weinheim 1955,S.944 u.1125

87. BÖHM,K.: Arzneim. Forsch. 9, 539 (1959)

88. KÜHNAU,J.: Klin. Wschr. 27, 294 (1949)

89. WILLSTÄTTER,R.: Ber. Dtsch. Chem. Ges. B. 47, 2874 (1914), zit. n. (9o)

9o. DAB VI., 3. Nachtrag (1959) DBR, Kommentar, Stuttgart 1959, S. 371

91. KÜSSNER,W.: Pharmazie 5, 266 (195o)

92. NEU,R.: Aus unserer Arbeit, Jubiläumsschrift Dr. W. Schwabe, Karlsruhe 1956, S. 39 ff.

93. FAGEDORN,P. u. NEU,R.: Arch. Pharm. 286, 486 (1953)

94. " " : " " 287, 73 (1954)

95. PORTER,W.L. u. Mitarb.: Arch. Biochem. 21, 273 (1949), zit. nach (92)

96. BRUNE,W.: Arch. Pharm. 287, 432 (1954)

97. HÖRHAMMER,L. u. HÄNSEL,R.: Arch. Pharm. 284, 276 (1951)

98. HÖRHAMMER,L., HÄNSEL,R. u. STRASSER,F.: Arch. Pharm. 285, 286 (1952)

99. WILSON,C.W.: J. Amer. Chem. Soc. 61, 23o3 (1939), zit. nach (98)

1oo. TAUBÖCK,K.: Naturw. 3o, 439 (1942), zit. nach (98)

1o1. HÖRHAMMER,L. u. HÄNSEL,R.: Arch. Pharm. 286, 447 (1953)

1o2. " " : " " 288, 315 (1955)

1o3. NEU,R.: Z. anal. Chem. 142, 335 (1954)

1o4. " : Chem. Ber. 87, 8o2 (1954)

1o5. Fa. HEYL u. Co., Chem.-Pharm. Fabrik, Hildesheim, pers. Mitt.

1o6. SUBSIDIA PHARMACEUTICA, Zürich 1959, Kommentar PM, S. 17

1o7. KUKOWKA,A.: Pharmazie 9, 44 (1954)

1o8. SALLER,K.: Lehrb. d. homöopath. Arzneim., Saulgau 1952, S. 46

1o9. BANZER,G.: Arzneitherapie d. prakt. Arztes, München 1955, S. 57

11o. SCHEELE,J. u. MATIS,P.: Medizinische 3, 693 (1952)

111. RATSCHOW,M. u. BÖDECKER,H.: Münch. med. Wschr. 94, 1368 (1952)

112. GIGGLBERGER,H. u. KLEIBEL,F.: Dtsch. med. Wschr. 77, 462 (1952)

113. METZGER,M. u. SPIER,H.W.: Dtsch. med. Wschr. 78, 1o68 (1953)

114. THE DISPENSATORY OF THE USA, 25 th Edition, S. 1533

115. HAGERS HANDBUCH, E II, Berlin 1958, S. 433 u. 2o3o

116. VOELKEL,A.: Ärztl. Forsch. 7, I/228 (1953),
ref.: Ber. ges. Phys. u. Pharmakol. 164, 23o (1954)

117. HIRT,R. u. BERCHTOLD,R.: Helv. chim. Acta 34, 2o21 (1951)
ref.: Ber.ges.Phys.u.Pharmakol.155,18 (1953)

118. PARROT,J.L. u. GABE,M.: C. r. Soc. Biol. 141, 363 (1947)
ref.: Ber.ges.Phys.u.Pharmakol.14o,316 (195o)

119. LAVOLLAY,J.: Sitzungsberichte Soc. Biol. Paris 139, 27o (1945)
zit. n.: KLAHN,J.: Geburtsh.u.Frauenheilk. 14, 355 (1954)

12o. MERZ,K.W.: Grundlagen der Pharmakologie, Stuttgart 1953, S. 231

121. LECOQ,R. u. Mitarb.: C. r. Soc. Biol. 144, 27 (195o)
ref.: Ber.ges.Phys.u.Pharmakol. 149, 172 (1952)

122. LECOQ,R.: C. r. Acad. Sci. (Paris) 253, 585 (1952)
ref.: Ber.ges.Phys.u.Pharmakol. 16o, 69 (1953)

123. MORGANO,G. u. SANNAZZARI,P.: Arch. "E.Maragliano" Pat. 5, 539 (195o)
ref.: Ber. ges. Phys. u. Pharmakol.
147, 26o (1952)

124. EICHHOLZ,F.: Lehrbuch d. Pharmakologie, Berlin 1947, S. 55

125. MØLLER,K.O.: Pharmakologie, Basel 1958, S. 189

126. WANKMÜLLER,A.: Pharm. Ztg. 89, 217 (1953)

127. " : " " 89, 777 (1953)

128. KREBS,K. u. WANKMÜLLER,A.: Naturw. 4o, 623 (1953)

129. REPPEL,L.: Planta medica 4, 199 (1956)

13o. OVERLACH,K.R.: Pharm. Ztg. 1o3, 83 (1958)

131. FIEDLER,U.: Vortrag 2.Tagung d. Dtsch. Ges. f. Arzneipflanzenforsch. u. -therapie, 3.-5.9.1954. in Karlsruhe

132. FIEDLER,U. u. HILDEBRAND,G.: Arzneim. Forsch. 5, 447 (1955)

133. KÜHNEL,H.J.: Arzneim. Forsch. 6, 498 (1956)

134. LAMPRECHT,W.: pers. Mitt. an KÜHNEL, zit. nach (133)

135. HINDEMITH,H.: Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 2o1, 397 (1943)

136. AUSTER,F.: Planta medica 4, 191 (1956)

137. HESSE,E.: Angew. Pharmakol., Berlin 1949, S. 118 u. 396

138. v. BERGMANN,G. u. FREY,W.: Handb.d.inn.Med., Berlin 1951, Bd.II,S.413

139. HAUSCHILD,F.: Pharmakol. u. Toxikol., Leipzig 1956, S. 47o

14o. FROMM,H.: Die therapeutischen Wirkungen der Rosskastanie, Diss. Hamburg 1957

141. SCHWEITZER,H.: Med. Klinik 47, 683 (1952)

142. SCHMIDT-THOME,J. u. PREDIGER,F.: Hoppe-Seylers Z. 286, 127 (195o)

143. WILBRAND,W. u. FREI,S.: Arch.exp.Path.u.Pharmakol. 225, 463 (1955)

144. JUNG,F. u. Mitarb.: Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 229, 281 (1956)

145. JENEY,E. u. URI,J.: Pharmazie 9, 533 (1954)

146. ISAAC,O.: Pharm. Ztg. 1o2, 71 (1957)

147. HAGERS HANDBUCH, E I, Berlin 1949, S. 1311

148. HÄNSEL,R.: Dtsch. Apoth. Ztg. 99, 1o39 (1959)

149. KÜCHMEISTER,H.: MERCKs Jahresbericht 61/62, 26 (1947/48)

15o. " : Klin. Wschr. 27, 297 (1949)

151. MATHIES,H.: Planta medica 2, 148 (1954)

152. MATIS,P. u. Mitarb.: Medizinische 4, 716 (1953)

153. HOCKERTS,T. u. ZABKA,R.: Ärztl. Forsch. 6/II, 133 (1952)

154. GAIER,H. u. JANTSCH,H.: Wiener klin. Wschr. 68, 16 (1956)

155. KÜCHMEISTER,H.: Ärztl. Forsch. 7/I, 1o2 (1953)

156. PERLICK,E. u. BÖDECKER,H.: Münch. med. Wschr. 93, 1465 (1951)

157. KOCH,W.: Medizinische 7, 326 (1956)

158. AUSTER,F.: Vortrag 3. Tagung d. Dtsch. Ges. f. Arzneipflanzenforsch. u. -therapie,

159. JAHN,H.: Ärztl. Forsch. 8/I, 41 (1954)

16o. SCHOELER,H.: Aus unserer Arbeit, Mitt. d. Fa. Dr. W. Schwabe, 2, Heft 4,S. 4 (1952)

161. RATSCHOW,M.: Ther. Woche 1, 2o6 (195o/51)

162. " : Ther. Gegenw. 9o, 129 (1951)

163. LAVOLLAY,J.: Compt. Rend. Acad. Sci. 271, 54o (1943), zit. n. (146)

164. LINDNER,J., FIGALA,N. u. HAGER,J.: Ber. chem. Ges. 67, 1641 (1934)

165. KOFLER,L. u. ADAM,P.: Arch. Pharm. 265, 652 (1927)

166. LUDEWIG,R. u. RÖMISCH,H.: Pharmazie 13, 543 (1958)

167. KLINGE,E.: DBP 95o o27 (1951)

168. SCHWABE, Dr. W. GmbH.: DBP angem., 3o h 2/o3

169. FISCHER,M.: DBP angem., 3o h 2/o3 (1953)

17o. KOFLER,L. u. RAUM,H.: Biochem. Ztschr. 219, 335 (193o)

171. STAHL,E.: Pharm. Rundschau 1, 1 (Heft 2) (1959)

172. BRIESKORN,C.H. u. BRINER,M.: Arch. Pharm 287, 429 (1954)

173. GERLACH,H.: Planta medica 6, 448 (1958)

174. BRIESKORN,C.H. u. CAPUANO,L.: Chem. Ber. 86, 866 (1953)

175. RÖMISCH,H.: Pharmazie 15, 33 (196o)

176. PASICH,B.: Dissertationes Pharm. (Polen) 11, 31 (1959)
ref. C.A. 53, 13 513 (1959)

177. TAKAMURA,K. u. Mitarb.: Nippon Daigaku Yakugaku Kenkyu Hokoku 2, 15 (1958) u. 2, 21 (1958)
ref. C.A. 53, 559o (1959)

178. BRIESKORN,C.H. u. HERRIG,H.: Arch. Pharm. 292, 485 (1959)

179. OVERLACH, K.R.: unveröffentlichte Untersuchungen

18o. VOGT,H.: Arch. Pharm. 289, 5o2 (1956)

181. THE MERCK INDEX, Rahway (USA) 1952, S. 184

182. WACHSMUTH,R.: Med. Klin. 50, 2041 (1955)

183. LORENZ,D. u. MAREK,M.L.: Arzneim. Forsch. 10, 263 (1960)

184. VOGEL,G. u. UEBEL,H.: Arzneim. Forsch. 10, 275 (1960)

185. UEBEL,H. u. PATT,P.: Arzneim. Forsch. 10, 280 (1960)

186. PATT,P. u. WINKLER,W.: Arzneim. Forsch. 10, 273 (1960)

187. WINKLER,W. u. PATT,P.: Naturw. 47, 83 (1960)

Nachtrag.

Nach Abschluss und Niederschrift der vorliegenden Arbeit wurden in Zusammenhang mit der Einführung des Präparates Reparil(R) einige Arbeiten aus den Laboratorien der Fa. Dr.MADAUS & Co. veröffentlicht, die sich auch mit dem Aesculus-Saponin befassen (183,184,185,186,187). Durch diese Veröffentlichungen werden einige der eigenen Angaben bestätigt.

Die vorstehend (S.33) als noch ausstehend bezeichnete pharmakologische Prüfung des reinen Aescin ist inzwischen erfolgt (183,184,185). Die untersuchte Substanz wurde von den Verfassern als "Aescin-MADAUS = Reparil(R)" bezeichnet.

Die Beschreibung hinsichtlich der Eigenschaften und der Chemie erfolgte durch PATT und WINKLER (186). Beim Vergleich dieser Angaben mit den eigenen Untersuchungen stellte sich heraus, dass "Aescin-MADAUS = Reparil(R)" identisch ist mit dem Aescin, das den eigenen Untersuchungen vorgelegen hat. Als Beweis hierfür kann angesehen werden, dass das von PATT und WINKLER aufgestellte IR-Spektrum für Reparil(R) genau dem eigenen IR-Spektrum für Aescin entspricht. Das Gleiche gilt für den Vergleich der IR-Spektren von Aescinol-Kalium, das von den Verfassern als Kalium-aescinolat bezeichnet wurde. Die von PATT und WINKLER angegebene Strukturformel für "Aescigenin", die sich auch in Anzeigen der Fa. Dr.MADAUS & Co. findet, entspricht jedoch nicht dem neuesten Stand der Forschung, da die Arbeit von CAINELLI, JEGER und Mitarbeitern (53) aus dem Jahre 1957 nicht berücksichtigt wurde.

Da wie ausgeführt Reparil(R) identisch ist mit dem nach dem Verfahren von MERKEL (54) gewonnenen Aescin, erhebt sich die Frage nach dem Primat der Isolierung von reinem Aescin. Diese muss jedoch zu Gunsten von MERKEL entschieden werden, dessen Verfahren bereits 1953 patentiert wurde. Vergleiche zwischen Reparil(R) und dem Aescin nach MERKEL sind von PATT und WINKLER nicht beschrieben worden, wie auch MERKEL's Arbeiten zur Aescinisolierung nicht zitiert wurden.

Es ist jedoch das Verdienst von WINKLER und PATT (187), erstmals Ionenaustauscher zur Aescingewinnung verwendet zu haben.

Unter Verwendung von Kationenaustauschern zur Isolierung des Aescins gaben WINKLER und PATT (187) eine Ausbeute von 2 % an, wobei jedoch keine Bezugssubstanz genannt wurde. MERKEL erzielte eine Ausbeute an Aescin von 2,5 %, bezogen auf geschälte, getrocknete und entfettete Samen.

Auch von PATT und WINKLER (186,187) wird zwischen Aescin und nativem Aesculus-Saponin unterschieden. Über eine Unterscheidung mit Hilfe papierchromatographischer Nachweise wurde jedoch nicht berichtet.

Pharmakologische Prüfungen des von MERKEL gewonnenen Aescin sind bisher nicht bekannt geworden. Andeutungen über die Durchführung solcher Prüfungen wurden jedoch von RÖMISCH (5o)gemacht.

Auf der Suche nach dem therapeutisch wirksamen Prinzip der Aesculus-Samen machten LORENZ und MAREK (183) die Beobachtung, dass entgegen der bisherigen Meinung bei parenteral verabfolgten Aesculus-Extrakten das Saponin das wirksame Prinzip darstellt. Bei der Versuchsanordnung der Verfasser hatte reines Aescin die grössten oedemhemmenden und fragilitätsmindernden Wirkungen gegenüber unbehandelten oder gar saponinarmen Extrakten. Ausserdem stellten die Verfasser fest, dass auch in zum Zwecke der Saponinentfernung vorbehandelten Auszügen mit pharmakologischen Methoden noch Saponin nachweisbar ist. Dass dieses auch papierchromatographisch möglich ist, und dass das Saponin nicht als Wirkstoff ausgeschlossen werden kann, wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen erwähnt (S.55). Diese Ergebnisse wurden somit jetzt von anderer Seite bestätigt.

LORENZ und MAREK (183) beobachteten jedoch nur eine Wirkung bei parenteraler Anwendung. Eine Wirkung nach oraler Applikation wird den Aesculus-Auszügen und auch dem Aescin abgesprochen. In der Literatur wird hierüber auch gegenteilig berichtet. Das von den Verfassern gleichfalls untersuchte Aescinol-Kalium erwies sich als unwirksam.

Über die Fragen Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus des Aescin äusserten sich VOGEL und UEBEL (184). Die Toxikologie des Aescin wurde von UEBEL und PATT (185) behandelt.

Als Ergebnis der aufgezählten Untersuchungen liegt in Repa-

ril(R) ein Präparat zur Injektion vor, das pro Ampulle 2 mg Aescin enthält. Die starke hämolytische Wirkung des Aescin wird bei der Injektion (nur i.v.) in Kauf genommen. Klinische Erfahrungen sind jedoch im Augenblick noch nicht greifbar.

Lebenslauf.

Am 29.3.26. wurde ich als Sohn des Kaufmanns Robert Overlach und seiner Ehefrau Hermine O. geb. Riecken in Neumünster geboren. Ich besuchte die dortige Oberschule und legte im Frühjahr 1944 die Reifeprüfung ab. Anschliessend wurde ich zum Wehrdienst einberufen. In den letzten Kriegstagen geriet ich in sowjetische Kriegsgefangenschaft, wurde jedoch nach einem halben Jahr als krank und nicht mehr arbeitsfähig entlassen.

Der erfolgten Zulassung zum Chemiestudium an der Universität Kiel im Wintersemester 1945/46 konnte ich nicht nachkommen, da als Folge der Kriegsgefangenschaft ein längerer Lazarettaufenthalt notwendig wurde. Am 1. April 1946 begann ich meine Ausbildung als Apothekerpraktikant, die mit der pharmazeutischen Vorprüfung im Frühjahr 1948 abschloss.

Ab Wintersemester 1948/49 studierte ich an der Universität Kiel zunächst Naturwissenschaften und Volkswirtschaft, nach Erhalten eines Arbeitsplatzes Pharmazie.Das Studium in Kiel endete mit dem Sommersemester 1953 und der pharmazeutischen Prüfung. Anschliessend war ich in verschiedenen Apotheken tätig. Die Approbation als Apotheker erhielt ich am 9. August 1954.

Die vorliegende Arbeit wurde Anfang 1957 in der Königl.Priv. Apotheke Schönberg/Holst. begonnen, aus äusseren Gründen Anfang 1958 unterbrochen und dann im Herbst 1958 in der "Apotheke am Bleeck" Bad Bramstedt/Holst. fortgesetzt und Anfang 1960 abgeschlossen. Während dieser Zeit war ich an der Universität Hamburg teils vollimmatrikuliert, teils als Gasthörer eingetragen.

Seit dem 1. März 1960 bin ich Leiter der Apotheke des Kreiskrankenhauses Stormarn in Bad Oldesloe/Holstein.

Meine akademischen Lehrer während des Studiums an der Philosophischen Fakultät der Universität Kiel waren die Herren Professoren und Dozenten

Bode, Diels, Grewe, Kleinfeller, Klemm, Lochte-Holtgreven, Maassen, Martin, Malorny, Moritz, Overbeck, Rosenmund, Tischler, Thiele, Vogt, Wulff und Zymalkowski,

während des Studiums an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Hamburg die Herren Professoren und Dozenten

Egle, Endres, Heyns, Malorny, Neuwald, Ruge und Zymalkowski.